

**Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und
Rehabilitation**

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Messung der inflammatorischen Aktivität
von Metallionen und Metall-Abriebpartikeln von
Endoprothesen im Vergleich zu Ultra-High-Molecular-Weight
Polyethylenen (UHMWPE) am Tiermodell**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kathrin Ebinger

aus

Reutlingen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sandra Utzschneider

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Christian Zeckey

Prof. Dr. med. Gerd Regel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Alexander Paulus

Dekan: Prof. Dr. med. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1. Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit.....	- 5 -
1.2. Hüftgelenksaufbau	- 7 -
1.3. Geschichte des Hüftgelenkersatzes	- 8 -
1.4. Pathophysiologie der aseptischen Prothesenlockerung	- 12 -
1.5. Material- und Gleitpaarungseigenschaften.....	- 14 -
1.5.1. Metallpartikel (CoCrMo)	- 16 -
1.5.2. Metallionen	- 19 -
1.5.3. Polyethylenpartikel.....	- 21 -
2. Material und Methoden	- 23 -
2.1. Tierversuch	- 23 -
2.1.1. Vorbemerkung	- 23 -
2.1.2. Versuchstiere.....	- 23 -
2.1.3. Versuchsmodell	- 24 -
2.1.4. Partikelherstellung und -analyse.....	- 25 -
2.1.5. Versuchsaufbau.....	- 27 -
2.2. Feingewebliche Untersuchung	- 33 -
2.2.1. Vorbereitung	- 33 -
2.2.2. HE-Färbung	- 33 -
2.2.3. Histologische Auswertung	- 34 -
2.3. Statistische Auswertung	- 36 -
2.4. Materialliste	- 37 -
3. Ergebnisse.....	- 41 -
3.1. Gewichts Differenz.....	- 41 -
3.2. Kniegelenkdurchmesser.....	- 42 -
3.3. Intravitalmikroskopische Ergebnisse	- 44 -
3.3.1. Fraktion rollender Leukozyten	- 44 -
3.3.2. Zahl adhärenter Zellen.....	- 47 -
3.3.3. Flussgeschwindigkeit.....	- 49 -
3.3.4. Funktionelle Kapillardichte.....	- 51 -

3.4.	Histologische Ergebnisse	- 53 -
3.4.1.	Histopathologischer Score nach Brackertz	- 53 -
3.4.2.	Mittlere Synovialmembrandicke	- 55 -
3.5.	Deskriptive histologische Auswertung	- 58 -
4.	Diskussion	- 69 -
5.	Zusammenfassung	- 86 -
Abkürzungen		I
Abbildungsverzeichnis		II - IV
Tabellenverzeichnis		IV
Literaturverzeichnis		V - XX
Eidesstattliche Versicherung		
Danksagung		

1. Einleitung

Entzündliche und degenerative Erkrankungen des Bewegungsapparates gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen in Deutschland. Sie liegen in der ökonomischen Belastung für die Gesellschaft dabei sogar noch vor den Tumorerkrankungen (2, 3).

Durch die großen Fallzahlen von Gelenkproblemen in einer alternden Gesellschaft generiert sich ein stetig steigender Bedarf an endoprothetischen Versorgungen. Diese Eingriffe führen durch Schmerzreduktion und verbesserte Funktionalität zu einer erheblichen Steigerung der Lebensqualität der Patienten und überzeugen zudem durch ein hohes Maß an Wirtschaftlichkeit (4, 5). Mit ca. 300 Fällen pro 100.000 Einwohner liegt Deutschland im internationalen Vergleich an der Spitze der Implantationsstatistik (5-7).

Früher war der künstliche Gelenkersatz Patienten in fortgeschrittenem Lebensalter und mit schwerer arthritischer Gelenkdestruktion vorbehalten (8). Dieses Kollektiv hat sich durch die steigende Aktivität im Alter und einer stark erweiterten Indikationsstellung in den letzten Jahrzehnten gewandelt (4). Zudem stellen die jüngeren und sehr aktiven Patienten deutlich höhere Anforderungen an den Gelenkersatz (9).

Mit den zunehmenden Implantationszahlen der Endoprothesen werden langfristig auch immer häufiger Revisionsoperationen, in denen diese Implantate ausgetauscht werden müssen, erforderlich. Beispielsweise waren das in der letzten statistischen Erhebung im Jahr 2014 über 60.000 Fälle in Deutschland (3). Wie in Abb. 1 dargestellt, steigen die Revisionsraten primärer Hüft-Totalendoprothesen, so genannter Hüft-TEPs, zusammen mit der Verweildauer der Implantate im Körper (10).

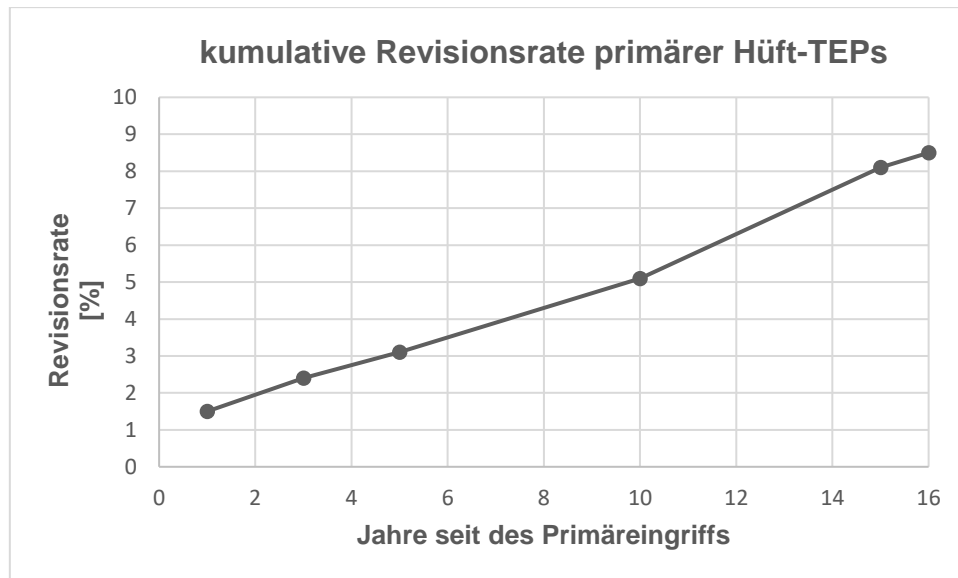


Abb. 1: prozentuale Revisionsrate primärer Hüft-Endoprothesen in den Jahren nach der Implantation (10)

Die aseptische Prothesenlockerung stellt einen Hauptlimitationsfaktor für die Verweildauer von Endprothesen im Körper dar (11). Nach überstandener Akutphase eines erfolgreich implantierten künstlichen Gelenks, ist die aseptische Prothesenlockerung in 55 - 70% der Fälle als Auslöser für eine erneute Operation angegeben (12-15). Weitere häufige Revisionsgründe sind, wie in Abb. 2 ersichtlich, Dislokationen, septische Lockerungen oder periprothetische Frakturen (15).

Die aseptische Lockerung der Endoprothese ist aufgrund der Häufigkeit der Revisionsbedürftigkeit für den Patienten und das Gesundheitssystem von größter Relevanz und liegt im Forschungsfokus dieser Arbeit.

Verteilung der Revisionsgründe primärer Hüft-TEPs

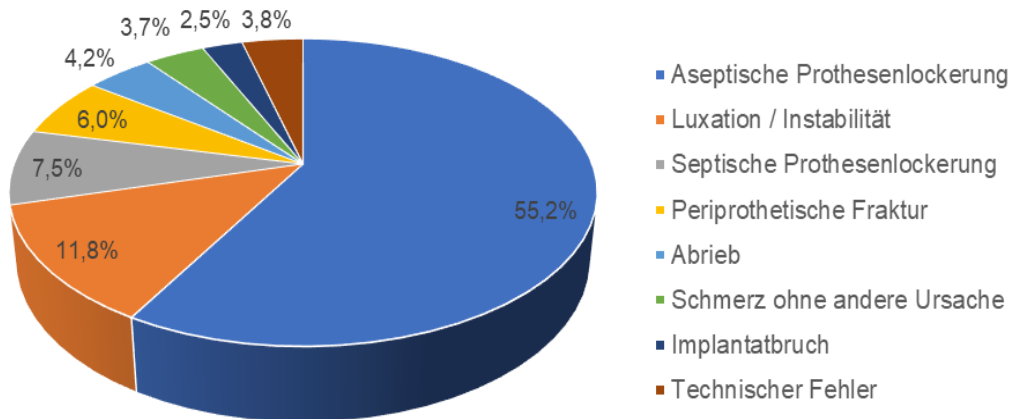


Abb. 2.: Verteilung der Revisionsgründe für Totalendoprothesen in Prozent nach Daten des weltweiten Endoprothesen-Registers 2013 (15)

Für die Gleitpaarung der Gelenksysteme kommt in verschiedenen Kombinationen Metall, Keramik und Polyethylen zum Einsatz, die unterschiedliche Verschleißigenschaften haben. Aufgrund der mechanischen Reibung der beiden Komponenten im Gelenk wird Materialabrieb erzeugt, der sich je nach Kombination unterscheidet (16, 17).

Bei zunehmender Inzidenz von Polyethylen-assoziierten Komplikationen bei der Kombination von Metall auf Polyethylen wurde um die Jahrtausendwende der Einsatz von Metall-auf-Metall (MoM) – Gleitpaarungen wiederbelebt. Begründet auf Berichte von einigen sehr guten Resultaten von MoM-Prothesen der ersten Generation mit Standzeiten von bis zu 45 Jahren, wurde in den letzten Jahrzehnten diese Gleitpaarungskombination in der Hüft-Endoprothetik nach langer Unterbrechung wieder aufgegriffen (18, 19). So entstanden die Metall-Metall-Paarungen der zweiten Generation (20, 21). Viele Probleme der ersten Generation wurden durch ein überarbeitetes Design und bessere Fertigungsqualität weitgehend behoben (22). Vor allem bei jungen Menschen sollte die Haltbarkeit und Stabilität der Prothesen verbessert werden, um Revisionseingriffe mit Prothesenwechsel hinauszuzögern (11, 20, 23, 24).

Der Ansatz mittels Kappenprothesen (Abb. 3) die Gelenkoberfläche zu erneuern („re-surfacing“) machte die MoM-Kombination erforderlich (25, 26). Die Vorteile von diesem Ansatz sind der geringere Knochenverlust bei der Implantation, eine weitgehend erhaltene Gelenkgeometrie sowie gute tribologische Eigenschaften (20, 26).



Abb. 3: Das Röntgenbild zeigt eine Versorgung der rechten Hüfte durch eine Kappenprothese

Sehr zeitnah zeigten sich entgegen der Erwartungen hohe Revisionsraten aufgrund der zum Teil schwerwiegenden

Reaktionen auf den metallischen Abrieb in den MoM-Lagern (27-30). Die hauptsächlich mechanisch freigesetzten Partikel führten periprothetisch zu destruktiven Weichgewebmassen, so genannte "entzündliche Pseudotumoren" und einer Lockerung der Prothese (27, 31-34).

Die aseptische Prothesenlockerung wird hauptsächlich auf die Reaktion des periprothetischen Knochens und Gewebes auf den entstehenden Abrieb der Prothesen zurückgeführt. Die kumulierenden Partikel und Ionen lösen daraufhin, über eine komplexe Signalkaskade, eine entzündliche Reaktion des umliegenden Gewebes aus (13, 35).

Obwohl *in vitro*, also außerhalb des lebenden Organismus, bereits unterschiedliche zelluläre Wirkungen der verschiedenen Zusammensetzungen der Partikelmaterialien, -größe und -morphologie gezeigt werden konnten, sind die Einzelheiten der entzündlichen Reaktion noch nicht vollständig aufgeklärt (36, 37).

1.1. Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Vor allem durch den mechanischen Abrieb der Materialien von Gleitpaarungspartner wird die aseptische Prothesenlockerung bedingt. Sie stellt nach erfolgreicher Implantation und Mobilisierung die Hauptursache für Revisionsoperationen von künstlichen Hüftgelenken dar. Nach heutigem Forschungsstand ist diese Reaktion durch ein inflammatorisches Geschehen ausgelöst (13, 38).

Durch den erneuten Einsatz von Metall-auf-Metall-Endoprothesen kam dem mechanischen metallischen Abrieb in künstlichen Hüftgelenken eine Sonderrolle zu (27, 28, 39, 40). Neben der bekannten häufigen Revisionsgründe wie der aseptischen Prothesenlockerung, Dislokationen, septische Lockerungen oder periprothetische Frakturen traten insbesondere bei jungen Frauen durch den Abrieb der MoM-Endoprothesen aseptische, von Leukozyten dominierte vaskulitische Läsionen auf (15, 39). Diese äußerten sich unter anderem in der Ausbildung von Pseudotumoren, also periprothetischen Weichteilwucherungen, die einige Jahre nach Implantation auftraten und lokal zu deutlichen ossären Destruktionen führten (27, 31, 33, 34). In Abb. 4 ist, mit Pfeilen markiert, ein solcher Pseudotumor abgebildet. Das starke Signal der Prothese im MRT ist zur Darstellung der Weichteile herausgerechnet (41, 42).

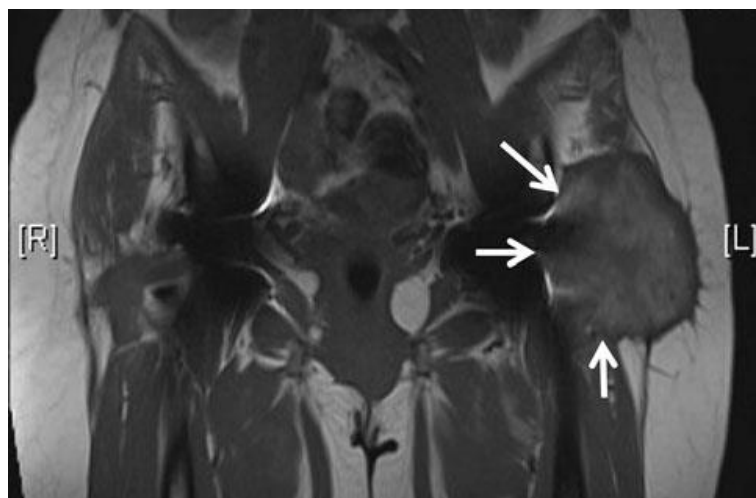


Abb. 4: Pseudotumor mit Pfeilen dargestellt in koronarem MRT mit Metall-Artefakt verminderter Sequenz ("MARS" - metal artifact reduction sequence) (42)

Die Untersuchungen konzentrierten sich bisher vor allem auf die Reaktion des gesamten metallischen Abriebs, also sowohl auf Metallpartikeln, als auch auf Metallionen (43-45). Bis heute ist jedoch ungeklärt, ob Metallpartikel oder Metallionen im Stande sind, lokale und systemische Reaktionen auszulösen, weshalb diese Studie initiiert wurde.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Metallabrieb nicht nur im Gewebe in unmittelbarem Kontakt zur Prothese verbleibt, sondern über das lymphatische System in andere Bereiche des Körpers wie das Knochenmark, die Leber oder Milz einwandert (46, 47). Die Besonderheit ist hierbei, dass speziell die elektrisch geladenen Teilchen, die Metallionen, im Verdacht stehen, die systemischen und lokalen Reaktionen auszulösen. Hierdurch rücken die Metallionen in den Analysefokus (48).

Ziel dieser Forschungsarbeit war die Untersuchung des inflammatorischen Potentials des metallischen Abriebs bei Hüftgelenksendoprothesen. An einem etablierten *in vivo* Tiermodell zur Messung der entzündungsauslösenden Aktivität des Abriebs (32, 33) wurde das inflammatorische Potenzial der Metallionen bei der Reaktion auf MoM-Abrieb *in vivo* untersucht und mit der Reaktion auf Metallpartikel und konventionelles Polyethylen verglichen.

Ein weitreichendes Verständnis der entzündlichen Prozesse ist für die Weiterentwicklung von Endoprothesen, zur Vorbeugung und gegebenenfalls der Behandlung von Pseudotumoren und Organmanifestationen aus MoM-Gleitpaarungen notwendig. Insbesondere ist bis heute ungeklärt, ob Metallionen im Vergleich zu Metallpartikeln die zentralere Rolle bei der Auslösung von lokalen und/oder systemischen Reaktionen spielen.

Zusammen mit den zu erwartenden Ergebnissen des Gemeinschaftsprojektes hinsichtlich der systemischen Wirkung soll ein Gesamtüberblick über das inflammatorische Geschehen erlangt werden und weiterführende Projekte geplant werden.

1.2. Hüftgelenksaufbau

In der Abb. 5 ist schematisch ein Hüftgelenk dargestellt. Beim Hüftgelenk handelt es sich um ein Nussgelenk, bestehend aus einem annähernd kugelförmigen Hüftkopf und der gegenüberstehenden Hüftpfanne (49).

Der Hüftkopf ist in der Regel etwa 3,5 - 5,5 cm groß und kann sich einer funktionellen Oberfläche bis ungefähr 30 cm² annähern (18).

Die Hüftpfanne, das Azetabulum, setzt sich aus Anteilen des Hüft-, Sitz- und Schambeins zusammen. Ungefähr 30% der Gelenkpfanne sind durch die knorpelige, halbmondförmige Facies lunata überzogen (18, 49).

Umgeben ist das Gelenk von einer Gelenkkapsel, welche in die Innenauskleidung der Gelenkhöhle, die Synovialmembran, übergeht (49).

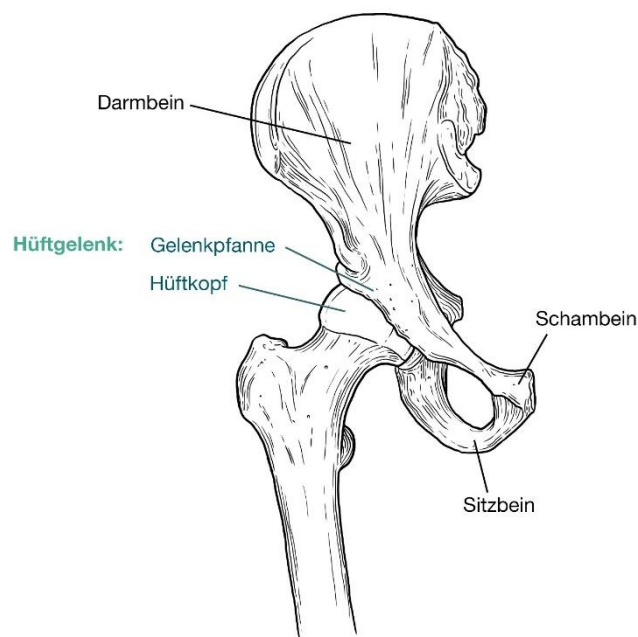


Abb. 5: Aufbau des nativen Hüftgelenks (1)

1.3. Geschichte des Hüftgelenkersatzes

Für einen historischen Überblick der Entwicklung im Bereich der Hüftgelenksendoprothetik folgt eine Darstellung der größten Weiterentwicklungen der Materialien und dem Weg zur aktuellen Forschung.

Schon 1890 gab es durch den Deutschen Themistokles Gluck erste Umsetzungsversuche, destruierte Gelenke mit Prothesen aus Elfenbein, also Hydroxylapatit, zu behandeln (50). Durch seine Experimente mit unterschiedlichen Materialien und der ersten Verwendung von Knochenzement gilt er als Wegbereiter der Endoprothetik (51). Die katastrophalen Ergebnisse führten allerdings schnell zu einem Verbot der weiteren Forschung durch den damaligen Präsidenten der deutschen Chirurgengesellschaft, Professor von Bergmann (50).

Die Forschung ruhte, bis Smith-Peterson in den 1920er Jahren eine Muldeninsertionsplastik entwickelte (52). Diese unfixierten Gelenkinterponate aus Glas, die lose auf den Hüftkopf gesetzt wurden, sollten die direkte Reibung beider Gelenkflächen aufeinander vermeiden (53). Bei unbefriedigenden Ergebnissen wurden andere Kunststoffe und 1938 schließlich Vitallium, eine Legierung aus Chrom, Kobalt und Molybdän eingesetzt (52).

Obwohl dieser Werkstoff bis heute erfolgreich in Gleitpaarungen eingesetzt wird und Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist, waren die Ergebnisse zu dieser Zeit noch unbefriedigend (8). Durch die Überlastung der knöchernen Hüftpfanne entstanden Osteolysen, Nekrosen und Frakturen des Azetabulums (53).

Nach dem zweiten Weltkrieg wurde erstmals von R. und J. Judet eine pilzförmige Hüftkopfteilprothese aus dem Kunststoff Polymethylmetacrylat (PMMA) mit einem Stil im Femurschaft verankert (54). Von diesem Material wurde ebenfalls bald Abstand genommen, weshalb diese Art der Prothese von Moore mit einer Chrom-Kobalt-Legierung bestückt wurde (55).

Trotz materialtechnischer Vorteile kam es zur Überlastung der knöchernen Pfanne mit Ausdünnung des Azetabulums bis hin zur Penetration des Metallkopfes ins kleine Becken und zu Lockerungen der Prothesen (54).

Parallel zur Weiterentwicklung der Total-Endoprothesen wurde das Konzept der Oberflächenerneuerung des Femurkopfes „Resurfacing“ mit Kobalt-Chrom-Molybdän legierten Hüftkappen-Prothesen durch Smith-Peterson 1938 beschrieben (53). Bis zur Etablierung der Totalendoprothese wurde die Smith-Petersen-Hüftkappen-Prothese, später auch mit einer Metall-Polyethylen-Gleitpaarung, standardmäßig als Hüftgelenkersatz eingesetzt (19, 56). Hauptsächlich aufgrund von frühem Implantatversagen, hohen Reibungswiderständen und Lockerung der Hüftkappe und zeitgleich guten Ergebnissen mit Totalendoprothesen wurde von den Hüftkappenprothesen Abstand genommen (19, 25, 53). Der nächste Schritt war die Fixierung von Metall-Polyethylen-Prothesen mit Knochenzement, was kurzfristig deutlich bessere klinische Resultate ergab (53). Durch den massiven Abrieb der Polyethylenpfanne und dessen Folgen traten mittelfristig doch sehr hohe Revisionsraten auf (53, 57). Das führte zu einer deutlichen Distanzierung von diesem Gleitpaarungspartner. Aufgrund der primär guten klinischen Ergebnisse und dem großen Vorteil, dass im Vergleich zu TEPs viel Knochen eingespart wird, wurde Anfang der 1990er Jahre die Entwicklung einer Hüftkappenprothese mit einer abriebarmen Metall-Metall-Gleitpaarung wieder aufgenommen (53, 58). Die Reaktion auf den Abrieb dieser Prothesen ist ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit.

Die Entwicklung der ersten Total-Endoprothesen, also ein Ersatz von Hüftkopf und Hüftpfanne aus Metall, wurde bereits vor dem zweiten Weltkrieg von Wiles beschrieben (59). Trotz ermutigender Ergebnisse kam es auch in den 1950ern durch ungenaue Herstellungstechniken zu hohem Metallabrieb und zu einer frühzeitigen Lockerung der Prothesen (53).

Revolutioniert wurde die Hüft-Endoprothetik durch Sir John Charnley (56). Mit Polymethylmetacrylat (PMMA) als Knochenzement fixierte er 1960 erstmals Kopf und Schaft der Totalendoprothese aus rostfreiem Stahl und die Hüftpfanne aus Polyethylen im Knochen (56).

Durch diese Fixierung wurden die Totalendoprothesen primär belastungsstabil und durch den Einsatz von Polyethylen verringerte sich die Reibung im Vergleich zu den MoM-Gleitpaarungen (53). Die hierfür von Charnley entwickelte Operationstechnik nannte er „Low frictional torque arthroplasty“, also ein Gelenkersatz mit niederem Reibungsdrehmoment (60).

Beim Einsatz von Ultra-high-molecular-weight Polyethylen (UHMWPE) als Werkstoffkomponente zeigten sich aber viele Fälle der periprotektischen Osteolyse (25). Diese wurden in der damaligen Zeit fälschlicherweise noch auf eine Knochendestruktion in Folge der Infektion und Sepsis zurückgeführt, obwohl kein Nachweis einer bakteriellen Infektion zu erbringen war (61).

In den Achtzigern und Neunzigern des letzten Jahrhunderts trat eine andere schwerwiegende Komplikation in den Vordergrund: die Lockerung der femoralen und acetabulären Komponenten der Endoprothesen (53). Diese Form der Lockerung wurde damals als „lysis cement disease“ – „Zementkrankheit“ betitelt (53). Dieser Prozess wurde zu dieser Zeit vor allem auf die mechanische Belastung durch Bewegung zurückgeführt (62, 63).

Im Zusammenhang mit der „Zementkrankheit“ wurde seit den frühen 1970er-Jahren die Rolle von endoprothetischen Abriebpartikeln und die Reaktion des periprotektischen Weichteilgewebes untersucht (53, 64). Schon in dieser Zeit wurde im periprotektischen Gewebe eine von Makrophagen dominierte Reaktion beschrieben (65, 66).

Eine Schwierigkeit stellte allerdings dar, dass der osteolytische Prozess weiterhin als „Zementkrankheit“ beforscht wurde. Die logische Konsequenz daraus wäre gewesen, dass sich alle Probleme mit dem Einsatz unzementierter Prothesen lösen würden, die dann auch als bedeutendste Innovation der 1980er eingeführt wurden (67, 68).

Durch die intensivere Beforschung wurde klar, dass es sich nicht um eine „Zementkrankheit“ handelt, sondern die periprotektische Osteolyse von Partikeln ausgeht (69).

Es handelt sich also um eine „Partikelkrankheit“. Diese setzt sich nicht nur aus Knochenzementpartikel, sondern auch aus Metallabrieb und Polyethylenpartikel zusammen (69). Seitdem fokussiert sich die Forschung auf diesen Bereich (70, 71).

Das Ziel der gesamten Materialforschung war und ist die längere Haltbarkeit und bessere Verträglichkeit von Endoprothesen im Körper. Im Jahr 2000 hat das National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) dafür eine Benchmark für die Lebensdauer von primären Hüftersatzoperationen herausgegeben, die auch bei der Aktualisierung 2014 bestehen blieb. Demnach werden nur Hüftgelenksendoprothesen empfohlen, die eine Revisionsrate von 10% oder weniger innerhalb von zehn Jahren gezeigt haben (72, 73).

Aus einem systematischen Review von Van der Weegen et al. geht hervor, dass diese Benchmark bis 2011 von keinem Modell der MoM-Hüftkappenprothesen in den veröffentlichten Studien zum Thema Hüftersatz erreicht wurde (74).

Dies zeigt, dass weiterführende und intensive Forschung im Bereich des künstlichen Gelenkersatzes unerlässlich ist.

1.4. Pathophysiologie der aseptischen Prothesenlockerung

Die Osteolyse-assoziierte Prothesenlockerung (Abb. 6) ist vor der Dislokation und der Infektion der häufigste Revisionsgrund (75, 76).

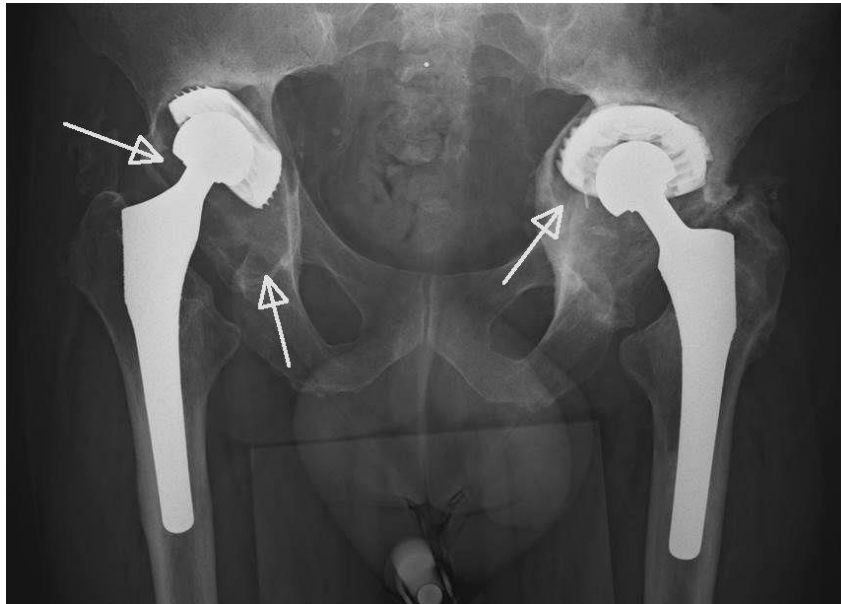


Abb. 6: Röntgen Beckenübersichtsaufnahme mit Lockerung der Endoprothesen und ausgeprägten Osteolysezonen (Pfeil) mit freundlicher Genehmigung des Klinikums Großhadern

Ein typischer Befund bei Patienten mit aseptisch gelockerten Prothesen ist die Entwicklung einer Synovialmembran-ähnlichen Grenzflächenmembran zwischen der Prothese und den Knochen (77). Hier wurden in Patientenpräparaten stark vaskularisierte, fibröse Membranen nachgewiesen, die vor allem Abriebpartikel, Makrophagen, Riesenzellen und Fibroblasten enthielten (78).

Freigesetzt werden die Abriebpartikel durch die mechanische Beanspruchung an den künstlichen Gelenkprothesen. Die Partikel treten in das periprothetische Gewebe über und werden dort zu einem Großteil von Makrophagen phagozytiert (79). Die körpereigenen Fresszellen regen über die Freisetzung verschiedener Cytokine und Mediatoren (wie IL-1, IL-6 und TNF- α) eine entzündliche Signalkaskade an (80).

Durch Chemokine (chemotaktische Zytokine) vermittelt, migrieren zusätzlich neutrophile Granulozyten sowie Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie, was die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Faktoren bedingt. Das führt zu einer erhöhten Osteoklasten-Differenzierung und -Reifung und damit zu einer Abnahme der Knochenbildung. Dieser Prozess bewirkt die Knochenresorption und damit die aseptische Prothesenlockerung (81). Auf molekularer Ebene wird diese proinflammatorische Kaskade über die Aktivierung der MAP-Kinase-Wege, Transkriptionsfaktoren, wie NFkappaB, und das Unterdrücken von Zytokin-Signalwegen eingeleitet (13).

Der genaue Ablauf der entzündlichen Signalkette ist bis heute jedoch noch nicht abschließend geklärt.

1.5. Material- und Gleitpaarungseigenschaften

Die Benennung der Endoprothesen erfolgt unter anderem über deren artikulierende Bestandteile (82). Bei der Namensgebung der Gleitpaarungen bezieht sich der erste Teil auf das verwendete Material des Hüftkopfs, der zweite Teil auf die Hüftpfanne (82). Beispielsweise besteht bei der CoCrMo/Polyethylen-Endoprothese der Hüftkopf aus Metall und die Hüftpfanne, also das Inlay aus Polyethylen (82).

Die artikulierenden Flächen der am häufigsten verwendeten Hüftgelenksimplantate bestehen am Hüftkopf aus Keramik, Metall oder keramisiertem Metall (10). Im Bereich der Hüftpfanne aus hoch quervernetztem Polyethylen, dem crosslinked Polyethylen (XLPE) oder Keramik (10, 83).

Man unterscheidet außerdem Totalendoprothesen (TEP) (Abb. 7 links) von Hüftkappenprothesen (Abb. 7 rechts) (10). Bei Hüft-TEPs werden der Gelenkkopf und die Gelenkpfanne ersetzt, bei Hüftkappenprothesen wird alleinig der Hüftkopf ersetzt (25, 84).

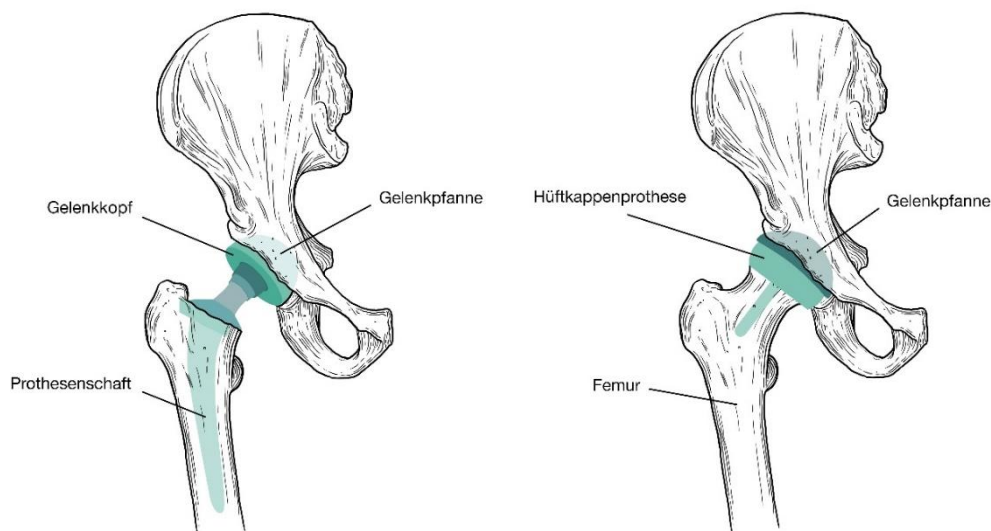


Abb. 7: schematische Darstellung einer Totalendoprothese (links) und einer Hüftkappenprothese (rechts) (1)

Die Abb. 8 zeigt die verwendeten Gleitpaarungspartner über einen Zeitraum von zehn Jahren. Hieraus wird ersichtlich, dass die eingesetzten Materialien und ihre Kombinationen nicht konstant verwendet werden, sondern dass deren Einsatz nach aktuellen Forschungen Schwankungen unterliegen (85). Orange dargestellt ist die Nutzung der Metall-auf-Metall-Gleitpaarung, deren primäre Implantationsrate nach einem Peak zwischen 2005 und 2009 wieder massiv zurückgegangen ist.

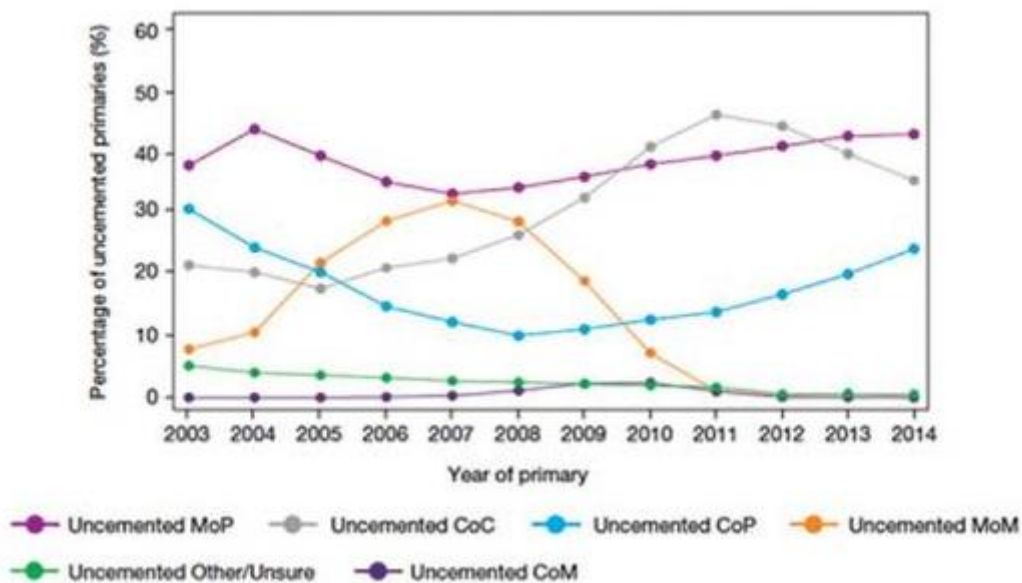


Abb. 8: zeitliche Veränderung der Prozentzahlen verschiedener Gleitpaarung unzementierter Totalendoprothesen nach Daten des weltweiten Endoprothesen-Registers (85)

X-Achse: Year of primary = Jahr der Primärendoprothetik

Y-Achse: Percentage of uncemented primaries = Prozentsatz unzementierter Primärendoprothesen

Lila: Uncemented MoP = unzementierte Metall-auf-Polyethylen-Gleitpaarung

grau: Uncemented CoC = unzementierte Keramik-auf-Keramik-Gleitpaarung

hellblau: Uncemented CoP = unzementierte Keramik-auf-Polyethylen-Gleitpaarung

orange: Uncemented MoM = unzementierte Metall-auf-Metall-Gleitpaarung

grün: Other/Unsure = Andere/unklare Gleitpaarung

dunkelblau: Uncemented CoM = unzementierte Keramik-auf-Metall-Gleitpaarung

1.5.1. Metallpartikel (CoCrMo)

Einen besonderen Stellenwert hat der metallische Abrieb, der sich sowohl aus Metallpartikeln als auch aus Metallionen zusammensetzt (45).

Beim Einsatz metallischer Werkstoffe kommt es zu elektrochemischer Korrosion, zur Freisetzung von Metallionen und chemisch aktiver Stoffe weshalb deren Biokompatibilität kritisch betrachtet werden muss (86).

Speziell richtete sich die Aufmerksamkeit in den letzten Jahren auf die Metall-auf-Metall-Gleitpaarung. Dieser Gleitpaarungstyp wird bereits seit über einem halben Jahrhundert eingesetzt und erlebte in den 1990er und 2000er-Jahren ein Wiederaufleben (8, 85). Zu diesem erneuten Einsatz kam es durch die Annahme, dass die Metall-Gleitpaarungen eine höhere Langlebigkeit und eine größere Belastbarkeit aufweisen würden (6). MoM-Gleitpaarungen produzierten in Voruntersuchungen weniger Abrieb und hatten gute tribologische Eigenschaften, deshalb wurde davon ausgegangen, dass sie weniger Osteolysen auslösen würden und damit länger im Patienten verbleiben könnten (20). Basierend auf dieser Annahme, wurden sie vor allem eingesetzt um jüngeren Patienten Endoprothesen mit besonders langer Haltbarkeit anzubieten und durch größere Hüftköpfe das Luxationsrisiko zu senken (87).

Sehr bald wurde von Fällen mit schweren periprotetischen Weichteilschäden berichtet, welche früh revidiert werden mussten und auch das Revisions-Outcome deutlich verschlechterten (32). Bedingt durch die hohen Abriebkonzentrationen beim Einsatz dieses Gleitpaarungstypus fiel eine, im Vergleich zu Metall-auf-Polyethylen- oder Keramik-auf-Keramik-Endoprothesen erheblich erhöhte Fünfjahres-Revisionsrate auf (88, 89). Gehäuft wurde über unerwünschte Reaktionen im umliegenden Gewebe, so genannte „adverse local tissue reactions“ (ALTRs) als Reaktion auf CoCrMo-Endoprothesen berichtet (27, 89, 90).

Zu den ALTRs werden Reaktionen in den periprothetischen Weichteilen gezählt. Darunter fallen die Ausbildung von Pseudotumoren, periprothetische Nekrosen und sterile lymphozytäre Inflammationen, auch „ALVAL“ – aseptic lymphocytic vasculitis-associated lesions genannt (91).

Die ALVAL setzt sich zusammen aus perivaskulären Infiltraten von T- und B- Lymphozyten und Plasmazellen, hochendothelialen Venolen, massiver Fibrinexsudation, der Akkumulation von Makrophagen, einer Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Nekrose (91).

Ein besonders hohes Auftreten von ALTRs wurde bei Metall-auf-Metall-Endoprothesen beobachtet (90, 92). Das Vorkommen von ALTRs beschränkt sich dabei nicht auf Metall-auf-Metall-Gleitpaarungen. Es wurde ebenso, wenn auch deutlich seltener, über ALTRs bei den konventionellen Metall-auf-Polyethylen-Gleitpaarungen berichtet (93-95).

Als weitere Form der Gewebereaktion wird die Metallose beschrieben. Bezeichnet wird durch diesen Begriff die makroskopisch sichtbare Verfärbung des periprothetischen Weichteilgewebes. Bei Patienten, die eine Metallose aufweisen, konnte ein höherer Verschleiß an der Endoprothese gezeigt werden, als bei Patienten ohne Verfärbung des um die Prothese liegenden Gewebes (96).

Die entstandenen Metallpartikel bleiben jedoch nicht ausschließlich in der Umgebung der Prothese, sondern sind ebenfalls in paraaortalen Lymphknoten, Leber, Milz und Knochenmark nachgewiesen worden (46, 47, 97). Hauptsächlich wurden die Partikel in kleinen Zellaggregaten aus Makrophagen lokalisiert (46, 47). Bei Untersuchungen nach Revisionsoperationen wurden höhere Konzentrationen von Metallionen in der Gelenkflüssigkeit und auch im Serum nachgewiesen (98).

Der Zusammenhang mit der erhöhten Serum-Metallionenkonzentration konnte aber nicht in allen Studien nachgewiesen werden (99-101). Das Risiko des Auftretens von ALTRs bei MoM-Gleitpaarungen scheint zu korrelieren, die klinische und prognostische Wertigkeit der Serummetallspiegel bleibt umstritten (102).

In Folge des vermehrten Einsatzes von Metall-auf-Metall-Gleitpaarungen wurde immer häufiger von der Bildung von aseptisch lymphozytär dominierten vaskulitischen Läsionen berichtet, die sich klinisch, einige Jahre nach Implantation einer mit Metall-Metall-Gleitpaarungen in Form von Weichteilwucherungen zeigen (39, 43, 103, 104). Von diesen sogenannten Pseudotumoren waren junge Frauen besonders stark betroffen (27, 33, 105).

Es wird geschätzt, dass etwa 1% der Patienten mit Metall-auf-Metall-Gleitpaarung innerhalb von 5 Jahren einen Pseudotumor entwickeln (27). Im periprotetischen Gewebe zeigen sich dabei hauptsächlich ausgedehnte Nekrosen und ein lymphozytäres Infiltrationsmuster mit Makrophagen (27, 31, 33, 106). Häufig kommt es zusätzlich zu einer vermehrten Vaskularisierung und teilweise wurden Koagulationsnekrosen nachgewiesen (31). Der genaue Auslösemechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Ausgegangen wird von einem multifaktoriellen Geschehen, das einerseits durch eine toxische Reaktion auf erhöhten metallischen Abrieb bedingt sein kann oder auch eine Hypersensitivitätsreaktion auf eine normale Abriebkonzentration darstellen kann (27, 39). Immunhistologischen Untersuchungen von Pandit et al. legen nahe, dass es sich bei der Ausbildung von Pseudotumoren um eine Typ IV Immunantwort handelt (31).

Einen weiteren Faktor für das Auftreten von ALTRs, stellt der individuelle Unterschied bei der Empfindlichkeit auf Verschleißprodukte der Endoprothesen jedes einzelnen Patienten dar (42). Auch bei wenig Endoprothesenabrieb wurden bei Patienten ALTRs beschrieben, was mit einer Hypersensibilität auf Metall in Verbindung gebracht wird (44, 103, 107).

1.5.2. Metallionen

Der Abrieb von Metall-auf-Metall-Endoprothesen enthält nicht nur die Metallpartikel an sich, sondern auch deren oxidierte Formen, die Metallionen (45). Für die CoCrMo-Legierung scheint der Hauptkorrosionsmechanismus eine passive Lösung von Metallionen zu sein (86, 108). Molybdän ist dabei in seiner metallischen Stufe sehr stabil, wohingegen vor allem Kobalt, aber auch Chrom in ihrer oxidierten Form vorliegen (45, 109). Metallionen spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Reaktion auf endoprothetischen Abrieb (110). Sie stehen, wie die Metallpartikel im Verdacht, schmerzhaft periprotetische Weichteilreaktionen mit Osteolysen und Implantatlockerung auszulösen (88).

Schon in den 1980er Jahren konnte gezeigt werden, dass Metallionen nicht nur periprotetisch wirken, sondern auch in Lunge, Nieren, Leber und Milz nachweisbar sind (111). Untersuchungen legen nahe, dass Kobalt- und Chrom-Ionen genotoxisch sowie zytotoxisch wirken und Überempfindlichkeitsreaktionen auslösen können (87).

Die Eliminierung von Kobalt und Molybdän geschieht hauptsächlich über die Nieren, wo eine toxische Wirkung nachweisbar ist (48, 112). Chrom neigt zu einer Akkumulation in verschiedenen Geweben des Körpers, führt aber hauptsächlich in der Niere zu einer Konzentration in den Epithelzellen der proximalen Nierentubuli was zu einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion und zur Induktion tubulärer Nekrosen führen kann (48, 112, 113).

In den Osteozyten, den reifen Knochenzellen wurde gezeigt, dass Kobalt-Ionen in der Lage sind Nekrosen auszulösen und es gibt Hinweise darauf, dass die osteogene Differenzierung, also die Ausbildung der Knochenzellen von Vorläuferzellen, von Kobalt- und Chrom-Ionen negativ beeinflusst werden (45, 114). Zudem geht man von einer dosisabhängigen Induktion der Mortalität von Makrophagen und Ausbildung von Nekrosen durch Kobalt- und Chrom-Ionen aus (115, 116). Bei der Auslösung der Zellmortalität scheint Kobalt toxischer als Chrom zu reagieren (115).

Um Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung bei einer Metall-auf-Metall-Gleitpaarung früh zu erkennen, wird die Messung von Metallionen im Serum angewendet (101, 102, 117, 118). Vor allem in den USA und Großbritannien werden die systemischen Kobalt- und Chrom-Konzentrationen als Surrogatmarker für die Fehlfunktion von Metall-auf-Metall-Endoprothesen verwendet (119). Bei erhöhten Metallionenspiegeln wurde eine Korrelation mit klinischen Symptomen und radiologisch sichtbaren, unerwünschten Reaktionen wie beispielsweise Osteolysen gezeigt (96, 120-122). Viele, aber nicht alle Patienten mit unerwünschten Gewebereaktionen, den ALTRs, einschließlich derer die Pseudotumoren entwickelten, zeigen hohe Verschleißraten (123).

1.5.3. Polyethylenpartikel

Ultrahochmolekulares Polyethylen (UHMWPE) ist ein technischer Kunststoff, der seit Mitte der Sechziger Jahre mit großem Erfolg in der Medizin eingesetzt wird und lange Zeit das Material der Wahl für Totalendoprothesen der Hüfte darstellte (10, 43, 84). Zu den positiven Eigenschaften des UHMWPE zählt eine besonders hohe Festigkeit, eine gute Belastbarkeit und ein niedriger Reibungskoeffizient (124). Das Hauptproblem beim Einsatz von Polyethylen ist allerdings der starke Verschleiß und die sich daraus ergebend hohe Konzentrationen an Abrieb (84).

Die Bildung großer Abriebmengen sind mit periprotetischer Osteolyse assoziiert (125). Die zyklische Belastung an den Gelenkoberflächen kann zu Ermüdungsbrüchen, Delamination und Kristallisation von Polymeren des Polyethylens führen (126, 127). Sauerstoff, der über Diffusion an die Endoprothesen-Oberflächen gelangt, bewirkt eine fortschreitende Oxidation des Polyethylens (125, 128, 129). Das wiederum führt zu einem Abbruch der Polymerketten und zur Veränderung des kristallinen Anteils des Polymers was in einer Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften resultieren kann (125, 128, 129).

Der entstehende Polyethylenabrieb rekrutiert vorwiegend Makrophagen, welche die Osteoklasten-vermittelte Resorption des periprotetischen Knochen triggern, was dann zur Prothesenlockerung und schließlich zur Revision der Prothese führen kann (130, 131). Die ausgelöste Reaktion der Makrophagen ist dabei abhängig von der Menge, der Größe und der Konformation der entstandenen Abriebpartikel (132-134). Die Progression der Osteolyse hängt zusätzlich von der Integrität der Grenzfläche des Knochenimplantats ab (132). Jeder zusätzliche Millimeter Verschleiß erhöht das Risiko einer Revision deutlich (131).

Die hohen Abriebmengen wurden auf multidirektionale Bewegungen, wie sie in Gelenken herrschen, zurückgeführt (135).

Dadurch entstand die Idee der Quervernetzung, welche die Beweglichkeit der UHMWPE-Polymere vermindern sollte (136). Durch Strahlungsquervernetzung des Polyethylens konnte dessen Abrieb reduziert werden (130). Highly cross-linked polyethylenes (XLPEs) werden durch Hochdosis-bestrahlung hergestellt, wobei die Erhöhung der Strahlendosis mit einer verbesserten Verschleißfestigkeit des Polyethylens einhergeht (137, 138). Die Verschleißraten nehmen dementsprechend mit zunehmender Strahlungsdosis drastisch ab, die Sättigungsdosis liegt hier bei etwa 150 kGy (136, 139).

Der Einsatz von hoch quervernetztem Polyethylen (XLPE) hat insgesamt die Verschleißigenschaften der Polyethylene deutlich verbessert (138, 140).

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuch

2.1.1. Vorbemerkung

Die im Kommenden beschriebenen operativen Tätigkeiten sowie die Unterbringung der Tiere waren im Zeitraum April 2015 bis Oktober 2016 im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin am Klinikum der Universität München, Standort Großhadern lokalisiert. Genehmigt wurde dies durch die Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantrag AZ: 55.2-1-54-2532-82.12). Alle am Tier durchgeführten Maßnahmen standen im Einklang mit der Tierschutz-Versuchstierverordnung – TierSchVersV.

Die vorbereitenden und weiterführenden Schritte wurden im Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation durchgeführt.

2.1.2. Versuchstiere

Bei den Tieren handelte es sich um weibliche Balb/C Mäuse mit einem mittleren Alter von sieben Wochen. Sie wurden eigens für Tierversuche von der Charles River Wiga GmbH gezüchtet (§§ 19 bis 24 TierSchVersV) und verfügten jeweils über ein Gesundheitszeugnis. Es fand eine 14-tägige Akklimatisation in der Tierhaltung statt. Nur Versuchstiere, die ein unauffälliges Fress-, Putz- und Spielverhalten zeigten, wurden in die Versuche aufgenommen und in die Untersuchungs- bzw. Kontrollgruppen randomisiert. Diese Verhaltensweisen wurden zusammen mit Gewichtskontrollen im Zeitraum der Versuche reevaluiert. Die Tiere wurden in vier Gruppen á 10 Tiere unterteilt.

Die Gruppenhaltung – vier Tiere pro Käfig – wurde bis zum Tag des Versuchsstarts in Käfigen mit solidem Boden auf Einstreu und einem zirkadianen Hell-Dunkel-Rhythmus eingehalten. Die Versorgung mit ausreichend Trinkwasser und Nahrung wurde zu jedem Zeitpunkt gewährleistet. Während der siebentägigen Einzelhaltung war die olfaktorische und akustische Kommunikation mit Artgenossen in benachbarten Käfigen immer sichergestellt. Als Enrichment-Maßnahmen wurden in jedem Käfig sowohl Nestmaterial aus Zellstoff, als auch Unterschlupfmöglichkeiten bereitgestellt.

Die zugeordnete Nummerierung bei Versuchsstart behielt das Versuchstier sowohl während der *in vivo* Versuche, als auch für die weiterführenden Untersuchungen bei.

2.1.3. Versuchsmodell

1998 wurde von Veihelmann et al. ein Modell zur Darstellung der Mikrozirkulation der Synovialmembran in murinen Kniegelenken für die Untersuchung der rheumatoiden Arthritis entwickelt (141). Abgewandelt von Zysk et al. wurde dieses Modell erstmals für *in vivo* Untersuchungen der inflammatorischen Reaktion auf Abriebpartikel von Endoprothesen weiterentwickelt (142). Diese, von uns verwendete Methode am Kniegelenk der Maus ermöglicht nicht nur eine Charakterisierung der partikelinduzierten Entzündungsreaktion, sondern auch die Auswirkungen der Partikel auf die Mikrozirkulation der Synovialmembran und auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.

2.1.4. Partikelherstellung und -analyse

Metallpartikel

Im Rahmen des DFG-geförderten Gemeinschaftsprojektes lag die Herstellung der Metallpartikel im Aufgabenfeld der Arbeitsgruppe Biomechanik und Implantatforschung der Orthopädischen Uniklinik Heidelberg. Diese wurden durch dauerhafte artikulierende Belastungen eines CoCr29Mo6-legierten Probekörpers in einer Pin-on-Plate-Prüfeinheit erstellt (143). Die Partikelanalyse ergab eine mittlere Größe der Metallpartikel von $61,25 \text{ nm} \pm 18,47 \text{ nm}$ und eine Rundheit von $0,64 \pm 0,16$. Die Form setzte sich aus 49% ovalen, 44% runden und 7% nadelförmigen Metallpartikeln zusammen (144). Sowohl Durchmesser, als auch Morphologie entsprechen dabei vergleichbarem Abrieb von Endoprothesen im klinischen Einsatz (144).

Metallionen

Die Metallionen wurden ebenfalls von der Heidelberger Arbeitsgruppe hergestellt. In einer Korrosionsmesszelle wurden hierfür solide CoCr29Mo6-legierte Werkstoffproben in PBS zur Korrosion gebracht und die Metallionenabgabe über ein elektrisches Potential forciert (143). Über eine hochauflösende, induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (HR-ICPMS) konnte der Gesamtmetallionengehalt (Kobalt, Chrom und Molybdän) von 20,5 mg/l bestimmt werden (145). Die Zielkonzentration von 200 µg/l wurde mittels PBS eingestellt. Die Heidelberger Arbeitsgruppe führte zusätzlich eine Ultrapurenanalytik durch, bei welcher sich der gelöste Metallionengehalt aus 4,3 mg/L Chrom, 13,7 mg/L Kobalt, 0,8 mg/L Molybdän und 1,7 mg/L Nickel zusammensetzte (145). Zur Eliminierung adhärenter Endotoxine erfolgt eine Hitzeinkubation der Metallionen-Lösung (143).

Polyethylenpartikel

Die Rostocker Arbeitsgruppe aus dem Labor für Biomechanik und Implantattechnologie der Universitätsmedizin war für die Generierung der quervernetzten Polyethylenpartikel zuständig. Die Partikel wurden unter standardisierten Bedingungen gemäß ISO Norm 14242-1 mit festgelegten Bewegungszyklen in einem Hüftabtrieb-Simulator generiert [Hüftabtrieb-simulator Type C3/1-08 bzw. Type C6/2-08, EndoLab® Mechanical Engineering GmbH, Rosenheim, Deutschland]. Die Keramik-Polyethylen-Gleitpaarungen bestanden im Hüftkopfbereich aus Oxidkeramik [Al₂O₃, Biolox® forte (28 mm), CeramTec GmbH, Plochingen, Deutschland] und die Pfanneninserts aus sequentiell quervernetztem Polyethylen [X3™, Stryker GmbH & Co. KG, Duisburg, Deutschland] (143).

Das Testmedium wurde dann für die Analyse der generierten Abriebpartikel dem Labor für Biomechanik und orthopädische Forschung der LMU München übergeben und durch Säuredigestion von organischen Bestandteilen befreit (146). Es war davon auszugehen, dass sich in dem Testmedium noch immer Endotoxine, also Lipopolysaccharide, die Bestandteil gramnegativer Bakterien sind, befinden. Um deren proinflammatorische Effekte auf die Versuchsergebnisse zu verhindern, wurde für die Eliminierung dieser Endotoxine die hausintern entwickelte Methode von Paulus et al. angewendet (147).

Bei der Partikelanalyse konnten per Rasterelektronenmikroskopie nur einzelne überwiegend runde, granuläre, <1 µm große Partikel beobachtet werden. Aufgrund dieser geringen Konzentration war eine weiterführende Analyse der Partikel nicht möglich.

Da der Bedarf des Gemeinschaftsprojekts mit dieser geringen Partikelmenge nicht gedeckt werden konnte, musste auf industriell generierte UHMWPE-Partikel umgestiegen werden. Die von BioEngineering Solutions Inc. durchgeführte Partikelanalyse ergab in allen Größenbereichen runde bis granuläre Partikel, im Durchmesser 1,07 µm groß.

2.1.5. Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau wurde zweizeitig realisiert. Am Tag 0 erfolgte die intraartikuläre Injektion. In den Kniegelenkspalt der Kontrollgruppe wurde PBS injiziert, in jeweils zehn Versuchstiere pro Gruppe entweder Polyethylenpartikel, Metallpartikeln oder Metallionen. Nach siebentägiger Inkubationszeit fand die intravitalmikroskopische Untersuchung statt.

Vorbereitung und Narkose

An beiden Versuchstagen wurde zunächst bei jedem Versuchstier das Gewicht ermittelt. Zur Hypothermieprävention wurde die Maus auf einer Wärmeplatte bei kontinuierlicher rektaler Temperaturkontrolle (Zielwerte: zwischen 36,5°C und 38,0°C) gelagert. Anschließend erfolgte die Narkoseeinleitung in der Induktionsboxe durch 5%iges Isofluran und einer Beimischung von 600 ml/min Sauerstoff über einen Vapor. Die Narkose wurde per Gesichtsmaske durch ein Gasgemisch aus 1,2%igem Isofluran mit Sauerstoff ($F_i O_2$ 35%) und Lachgas über den Vapor aufrechterhalten. Dieses Mischverhältnis wurde an den Bedarf des Tieres angepasst. Mittels Applikation eines arteriellen Katheters und Drucktransducers am proximalen Mäuseschwanz-Drittel wurde der Blutdruck überwacht. Durch eine Dexpanthenol-Salbe (5%) wurde einer Austrocknung der Augen während der Narkose vorgebeugt.

Tag 0 – Intraartikuläre Injektion

Am Tag 0 folgte auf die bereits beschriebenen Schritte mit Hilfe eines Standard-Messschiebers die Ermittlung der Größe der Maus und deren Kniegelenk-durchmesser (Messgenauigkeit 0,01mm).

Nach der Identifikation der Patellarsehne und des Kniegelenkspalts erfolgte die Injektion von 50 µl Suspension über eine Mikrokanüle (Abb. 9). Diese Suspensionen wurden jeweils von einem ausgegliederten Laboratorium auf Endotoxine untersucht und für endotoxinfrei befunden. Die pro Maus applizierte Partikel-/ Ionenmenge



Abb. 9: Intraartikuläre Injektion von 50 µl der Suspensionen

orientierte sich an der Konzentration, die in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit Endoprothesen bei Revisionsoperationen gemessen wurden (98, 148).

Je nach Gruppe handelte es sich hierbei um:

- CoCr29Mo6 - Metallpartikel: 0,1 Vol.-% - 8,3 mg/ml
- Metallionen 200 µg/l
- UHMWPE 0,1 Vol.-%
- PBS-Lösung 0,1 Vol.-%

Vor der Applikation der CoCr-Metallpartikel und der UHMWPE-Partikel wurden diese mittels Ultraschall dispergiert und desagglomeriert.

In einem Einzelkäfig in ruhiger, abgedunkelter Umgebung erwachte das Tier aus der Narkose und wurde in konstanten Abständen auf regelmäßige Atmung, Kreislauf und Puls überwacht.

Tag 7 – Intravitalmikroskopie

Nach der Durchführung der beschriebenen Schritte wurde für die Bewertung der Schwellung des murinen Kniegelenks die erneute Messung des Kniegelenkumfangs durchgeführt.

Für die Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe und zur fortlaufenden Vorbeugung einer Dehydratation durch isotonische Kochsalzlösung wurde ein peripher venöser Zugang gelegt. Dies geschah über die Katheterisierung einer Schwanzvene mittels 0,4mm ID / 0,8mm OD Polyethylenschlauch und Insulinnadeln. Unter kontinuierlicher Kreislaufüberwachung erfolgte in 45° fixierter Flexion die Präparation des Gelenkspalts. Nach der Desinfektion des Operationsgebiets wurde der Hoffa Fettkörper, der das Synovialgewebe auf der inneren Gelenkoberfläche enthält, freigelegt (Abb. 10). Der Zugangsweg war eine vertikale Hautinzision mit horizontaler Durchtrennung des Ligamentum patellae um das Corpus adiposum infrapatellare.



Abb. 10: Darstellung der Patellarsehne

Das Austrocknen des Präparats wurde durch Wasserimmersion, also einer Unterspülung des Deckglases, welches auf die Haltevorrichtung des Kniegelenks aufgelegt wurde, mit steriler isotoner Kochsalzlösung vermieden. Ein Tropfen zusätzlicher Kochsalzlösung wurde auf das Deckglas zur intravitalmikroskopischen Messung mittels Immersionsobjektiv des Auflichtmikroskops aufgebracht um maximal eine 550-fache Gesamtvergrößerung zu erreichen (149).

Durch die Applikation von Rhodamin 6G in einer Konzentration von 0,15 mg/kg Körpergewicht, gelöst in einer sterilen Kochsalzlösung, wurden Leukozyten fluoreszenzmarkiert und mit Hilfe des Filter-Sets 15 (Bandpass 546/12, Farbteiler 580, long pass 590, Anregungsbereich grün) dargestellt.

Es wurden pro Tier drei Videoaufnahmen á 30 Sekunden rhodamin-kontrastiert erstellt. Dies ermöglichte, die definierten Zielgrößen der vorbeikommenden (passing), rollenden (rolling), und adhären (sticking) Leukozyten sowie die Flussgeschwindigkeit festzuhalten.

Das Filter-Set 09 (Bandpass 450-490, Farbteiler 510, long pass 520, Anregungsbereich blau) stellte, nach erfolgter Markierung mit dem Plasmamarker Fluoresceinisothiocyanat (FITC) - Dextran in einer Dosierung von 15 mg/kg Körpergewicht, das kapilläre Netzwerk dar.

FITC-Dextran-kontrastiert wurden weitere dreimal 30 Sekunden lange Videosequenzen aufgezeichnet. Dies diente der Messung der funktionellen Kapillardichte (Functional capillar density – FCD) als Maß der nutritiven Perfusion des Gewebes (150).

Videoauswertung der Intravitalmikroskopie

Die Auswertung der erstellten Aufnahmen wurde offline über CaplImage™, ein speziell für computergesteuerte Bildanalyse in der Mikrozirkulationsforschung entwickeltes Programm, vorgenommen.

Zunächst wurde der Gefäßdurchmesser in Mikrometern ermittelt. Hier wurden pro Gefäß sechs Messungen des Abstands der gegenüberliegenden Gefäßwände gemittelt.

Darauf folgte die Erhebung der intravasalen Blutflussgeschwindigkeit anhand der Geschwindigkeit der Erythrozyten in der Mitte des jeweiligen Gefäßes.

Für die Auswertung der leukozytären Parameter wurden der Gruppe „Passing“ alle Leukozyten zugeordnet, die in der Geschwindigkeit des Blutstromes durch das Gefäß flossen. Leukozyten, die sich dagegen langsamer als der Blutstrom fortbewegten und dabei mit der Gefäßwand interagierten, wurden als „Rolling“ definiert. Als „Sticking“ galten Zellen, die über die halbminütige Beobachtungszeit an der Endothelwand anhafteten.

Die „Zahl adhärenter Zellen“ stellte die Menge der gezählten anhaftenden Leukozyten die über den Aufnahmezeitraum, bezogen auf die Fläche (mm²) der endothelialen Oberfläche, an einem Punkt anhängend waren, dar:

$$\text{Anzahl adhärenter Zellen} = \frac{\text{Sticking}}{d \times \pi \times L}$$

Zeichenerklärung:
d = Gefäßdurchmesser (μm)
π = Kreiskonstante (3,14)
L = Gefäßlänge (μm)

Um die rollenden Leukozyten im Verhältnis zu allen, durch das Gefäß kommenden, Leukozyten einzuordnen, wurde die Fraktion rollender Leukozyten berechnet:

$$\text{Fraktion rollender Leukozyten} = \frac{\text{Rolling}}{\text{Rolling} + \text{Passing}}$$

Aus drei Gesichtsfeldern pro Tier wurde die funktionelle Kapillardichte anhand der Länge der Kapillaren, die durch den Plasmamarker wahrnehmbar wurde, gemessen.

Serumgewinnung

Sich an den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde orientierend (151), wurde zur Gewinnung des Mäuseserums eine intrakardiale Punktion an dem weiterhin narkotisierten Tier durchgeführt. In Rückenlage wurde in der Medianlinie hinter dem Xiphoid gezielt langsam punktiert um einem Herzkollaps vorzubeugen. So wurden 0,2 ml Blut in eine heparinisierte Insulinspritze aufgezogen. Um das Serum von den weiteren Blutbestandteilen zu trennen, wurde es für zehn Minuten bei 1000-3000x g zentrifugiert, der Serumüberstand abpipettiert und in einem geschlossenen Gefäß bei -20 °C gelagert um Zytokinbestimmungen anzuschließen, die über den Umfang der vorliegenden Arbeit hinaus gehen.

Euthanasierung, Präparation und Fixierung

Darauf folgte die schmerzlose und sichere Euthanasierung des Versuchstieres durch eine intrakardiale Überdosis des Betäubungsmittels Pentobarbital (0,5 ml).

Innerhalb von 20 Minuten nach Eintritt des Todes erfolgte die Desinfektion der Maus mit 70%igem Ethanol und die Entnahme beider Kniegelenke unter einer sterilen Sicherheitswerkbank. Für die, im Großprojekt durchgeführten, immun-histochemischen Untersuchungen wurden außerdem Milz, Lungen, Leber und Nieren entnommen. Die entnommenen Knie und Organe wurden anschließend in, mit 4-%igem Formalin gefüllten, Einzelgefäßen fixiert.

2.2. Feingewebliche Untersuchung

2.2.1. Vorbereitung

Nach einer mindestens 24-stündigen Formalinfixierung wurden die murinen Knie für vier Tage mit der speziellen Entkalkungslösung Osteosoft® entkalkt. Die Paraffineinbettung der Präparate in Einbettkassetten erfolgte zusammen mit der Entwässerung im Entwässerungsautomaten. Zur Herstellung mikroskopischer Präparatschnitte von 2µm Dicke wurde der Paraffinblock am Mikrotom geschnitten. Mit dem Ziel der Reduktion der Oberflächenspannung und damit der Verhinderung von Faltenbildung wurden die Schnitte auf ein 36°C warmes Wasserbecken übertragen und anschließend auf Adhäsions-Objektträger gezogen. Zur Trocknung der Gewebeschnitte wurden sie auf einen 75°C warmen Objektträger-Strecktisch gelegt.

2.2.2. HE-Färbung

Für eine optimale mikroskopische Darstellung der Synovialmembran sind ungefärbte Gewebeschnitte zu kontrastarm. Deshalb wurde eine Hämatoxilin-Eosin-Übersichtsfärbung nach Ehrlich an den angefertigten Feinschnitten durchgeführt (152). Das Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie beispielsweise die sauren Glykosaminoglykane des Knorpels und die DNA im Zellkern blau (153). Eosin wird zur Gegenfärbung verwendet und färbt die übrigen azidophilen Strukturen rot an (153).

Die Schnitte wurden dafür, nach weiterem Trocknen im 60°C warmen Trockenschrank, in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt. Anschließend wurde mit der jeweiligen Farblösung gefärbt und nach einer aufsteigenden Alkoholreihe eingedeckt.

2.2.3. Histologische Auswertung

Zur Qualifikation der inflammatorischen Aktivität der injizierten Suspensionen wurden die erstellten Gewebeschnitte histologisch begutachtet. Pro Versuchstier wurde je ein repräsentativer HE-gefärbter Gewebeschnitt des infiltrierten linken Kniegelenks, sowie des nicht eingespritzten rechten Kniegelenks ausgewertet.

An dem digitalen Mikroskop M8 wurden mit der zugehörigen Software die Dicke der synovialen Membran und der Brackertz-Score (vgl. Tabelle 1) ausgewertet (154). Zusätzlich erfolgte eine deskriptive Beurteilung der Kniegelenkschnitte. Hier wurde das Augenmerk auf das Vorliegen von Auffälligkeiten im Knochenmark, Veränderungen an der Epiphysenfuge, knöcherne Umbauten, Infiltrate und Periostverdickungen gelegt (Abb. 11).

Die Dicke der synovialen Membran wurde an sechs definierten Punkten gemessen. In der Sagittalebene lagen jeweils vier Punkte an der ventralen und zwei Punkte an der dorsalen Kniegelenkfläche.

Die gemessenen Werte beinhalteten die synovialen Deckzellen, das lockere Bindegewebe mit Blut- und Lymphgefäßen und Nervenfasern. Nicht inkludiert wurde das perikapsuläre Fett- und Muskelgewebe.

Zur Anwendung kam außerdem der histopathologische Score, der erstmals durch Brackertz et al. 1977 zur Graduierung einer Gelenkentzündung Verwendung fand. Der Schweregrad der entzündlichen Reaktion wurde entsprechend des Ausmaßes der Deckzell-Hyperplasie, der Infiltration durch mononukleäre Zellen und der Pannusformation durch Werte von null bis vier beschrieben (154).



Abb. 11: Darstellung von einem unbehandelten murinen Kniegelenk ohne inflammatorische Reaktion in HE-Färbung in 50-facher Vergrößerung

Maßstab im Bild: 200µm

Brackertz-Score Merkmal	0	1	2	3	4
Synoviale Zellschicht	unauffällig	unauffällig	2-3 Zellreihen	≥3 Zellreihen	≥3 Zellreihen
Mononukleäre Zellen	unauffällig	vereinzelt	verstreut	dichte Infiltration	dichte Infiltration
Definierte Arthritis	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
Pannus mit Erosion von Gelenkknorpel und sub-chondralem Knochen	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja

Tabelle 1: Histopathologischer Score nach Brackertz et al. (154)

2.3. Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Programms SPSS Statistics wurde die statistische Auswertung durchgeführt. Aufgrund des begrenzten Stichprobenumfangs von $n=10$ kann nicht automatisch von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Deshalb wurde als multivarianter Test für unabhängige Stichproben die Kruskal-Wallis-Analyse verwendet. Sich daraus ergebende signifikante Ergebnisse (Signifikanzniveau $p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen wurden als Post-hoc-Test durch multiple paarweise Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Hierbei wurde mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur eine Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Vergleichen neutralisiert. Dadurch ergab sich ein adjustierter Signifikanzwert von $p^* < 0,0083$. Mit einem Stern * wurden signifikante Werte gekennzeichnet.

Die Angabe des Mittelwerts „MW“ erfolgte plus / minus des Standardfehlers „SEM“. Als statistisch signifikant gilt im Folgenden der adjustierte Signifikanzwert nach Bonferroni von $p^* < 0,0083$.

Für die übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse wurde auf Abkürzungen der Gruppennamen zurückgegriffen:

- PBS = Kontrollgruppe mit phosphatgepufferter Salzlösung
- (UHMW)PE = (ultrahochmolekulargewichtiges) Polyethylen
- MI = Metallionen
- MP = Metallpartikel

Die grafische Darstellung der Werte erfolgte durch Box-Plots und Balkendiagramme.

2.4. Materialliste

Produkt	Hersteller
Balb/C-Mäuse	Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland
Datenbank zur Erfassung der Zucht und Haltung von Versuchstieren: Tier-Base	T.Base license version TBv570b99, Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
Tiernahrung Ratte/Maus-Haltung, Extrudat	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
UHMWPE	Continuum Blue Ltd, Cardiff, UK
Laborwaage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Messschieber 150mm	Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
OP-Tisch Heizplatte	KE-Gerätebau Effenberger, Pfaffing, Deutschland
Temperatursonde	Hugo Sachs, Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
arterieller Katheter	SIMS Portex Ltd, Smith Medical, Kent, UK
Drucktransducer	Sirecust 300 D, Siemens AG, München, Deutschland
Dräger Isofluran-Vapor	Drägerwerk AG Co.KgaG, Lübeck, Deutschland
Forene ® Isofluran	Abbott GmbH Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Dexpanthenol-Salbe 5% Bepanthen®-Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator LABSONIC® M	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Ultraschallbad: Bandelin Sonorex Super RK510H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Einmalkanülen STERICAN (Gauge 27)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Polyethylenschlauch (Portex ® Polyethylen- Tubing 0,4 mm ID/0,8 mm OD)	Smith Medical International Ltd., Kent, UK
isotone Kochsalzlösung	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Deckglas	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Mikrokanüle (Gauge 33)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Endotoxintestung	Lonza Verviers Sprl, Verviers, Belgien
Hautdesinfektionsmittel Cutasept	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Rhodamin 6G	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Fluoresceinisothiocyanat- Dextran	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Immersionsobjektiv Archoplan 20 x / 0,5 W	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Auflichtmikroskop Axiotech Vario 100HD	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Videozeitgenerator VTG - 33	FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan
Digitaler Videokassettenrecorder DSR-45P	Sony Europe Ltd., Berlin, Deutschland
Videobildschirm PVM-20M2MDE	Sony Europe Ltd., Berlin, Deutschland

Videokassetten: Panasonic Digital Video Cassette	AY-DV124AMQ, Panasonic Deutschland, Hamburg, Deutschland
CapImage™	Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 I.E:	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Zentrifuge Elmi Skyline	ELMI Ltd laboratory equipment, Riga, Lettland
Gefrierschrank -20°C: Liebherr Premium No Frost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Pentobarbital Narcoren	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Buprenorphin	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
Ethanol 70% (vollständig vergällt mit Methylketon)	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU, München, Deutschland
Sterile Sicherheitswerkbank LaminAir	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Neutral gepufferte Formaldehydlösung 4%	Microcos Products GmbH, Garching, Deutschland
CapImage™	Dr. Zeintl, Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland
Knochenentkalkung Osteosoft®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Entwässerungsautomat Hypercenter XP	Thermo Shandon GmbH Frankfurt, Deutschland
Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraffinausgießstation Leica EG 1160	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom Leica RM2255	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Microtom Blade N35HR-pfm	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan

Wasserbad GFL 1052	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. GK, Braunschweig, Deutschland
Objektträger-Strecktisch Typ 12801	MEDAX GmbH Co.KG, Rendsburg, Deutschland
Trockenschrank FED 53	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Färbeküvetten	Wagner & Munz GmbH, München, Deutschland
Abzug 2-453-DAND	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze, Deutschland
Ethanol 96% vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU, München, Deutschland
Ethanol 99% vergällt mit 1% Petrolether	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
Xylol reinst >98%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
Mayer`s Hematoxylin Solution	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y Solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
M8 Microscope and Scanner	PreciPoint GmbH, Freising, Deutschland
Software Mikroskop: PreciPoint software	PreciPoint GmbH, Freising, Deutschland
IBM SPSS Statistics 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1. Gewichtsdifferenz

Die Versuchstiere wogen zwischen 18 g und 25 g. Sieben Tage nach Injektion der jeweiligen Suspensionen kam es über alle Gruppen hinweg zu keiner signifikanten Veränderung des Körpergewichts ($p = 0,979$) (Abb. 12).

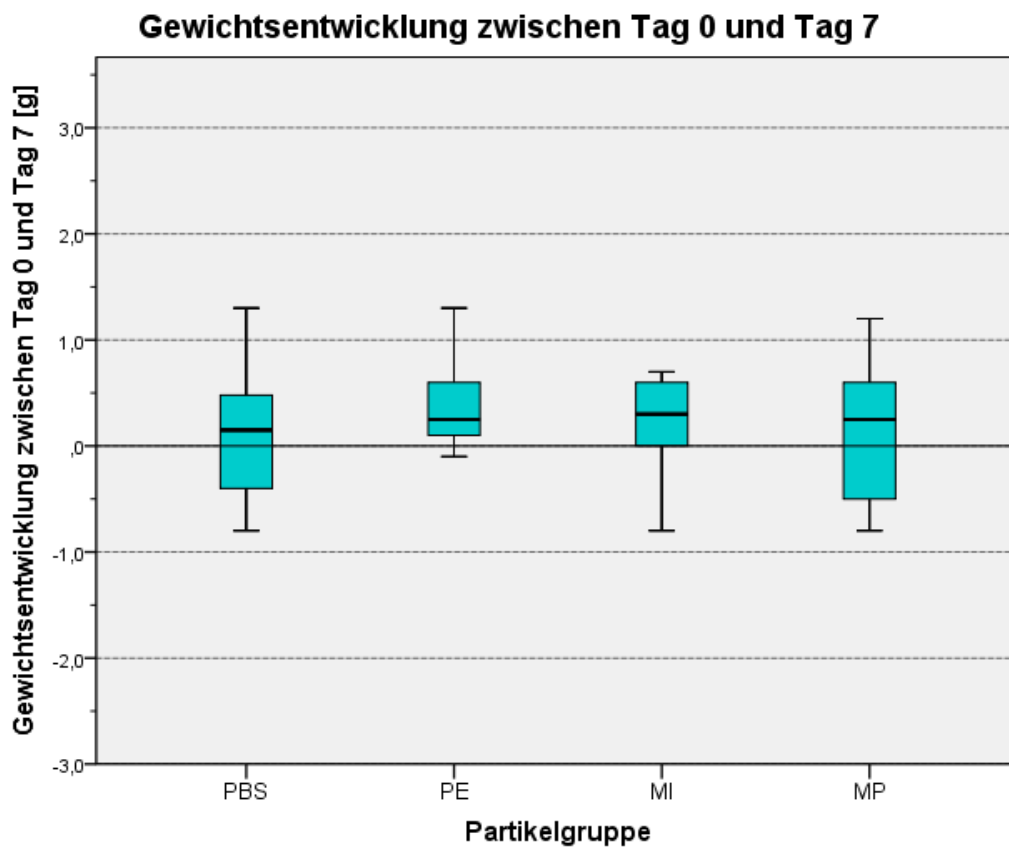


Abb. 12: Darstellung der Gewichtsänderung in Gramm der Versuchstiere zwischen dem Tag der Injektion und dem Zeitpunkt der intravitalmikroskopischen Untersuchung (Tag 7)

3.2. Kniegelenkdurchmesser

Der Vergleich der Mittelwerte aus der Differenz des Kniegelenkdurchmessers vor der Einspritzung und sieben Tage nach der Injektion ergab eine signifikante Zunahme in der Gruppe der Metallpartikel (MW 0,6 mm \pm SEM 0,2 mm; $p^* < 0,001$) und der Metallionen (MW 0,2 mm \pm SEM 0,1 mm; $p^* = 0,002$) im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (MW 0,0 mm \pm SEM 0,10 mm) (Abb. 13).

Dagegen ergab sich keine signifikante Zu- oder Abnahme des Kniegelenkdurchmessers nach der Injektion von Polyethylenpartikeln (MW 0,1 mm \pm SEM 0,0; $p = 0,218$) verglichen mit der Kontrollgruppe.

Auf Metallpartikel reagierten die Tiere mit einer signifikant stärkeren Vergrößerung von dem Durchmesser der murinen Kniegelenke, verglichen mit der Reaktion auf Polyethylenpartikel ($p = 0,004$) (Abb. 13).

Bei dem Vergleich der Zunahme der Kniegelenksdicke zwischen der Metallpartikel- und der Metallionengruppe bestand die Tendenz für eine stärkere Reaktion auf Metallpartikel. Es wurde mit $p = 0,043$ aber kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen (Abb. 13).

Ebenso tendierten die Mäuse nach der Injektion von Metallionen im Vergleich zu Polyethylenpartikeln ohne Signifikanz zu einer Zunahme des Kniegelenkdurchmessers ($p = 0,043$) (Abb. 13).

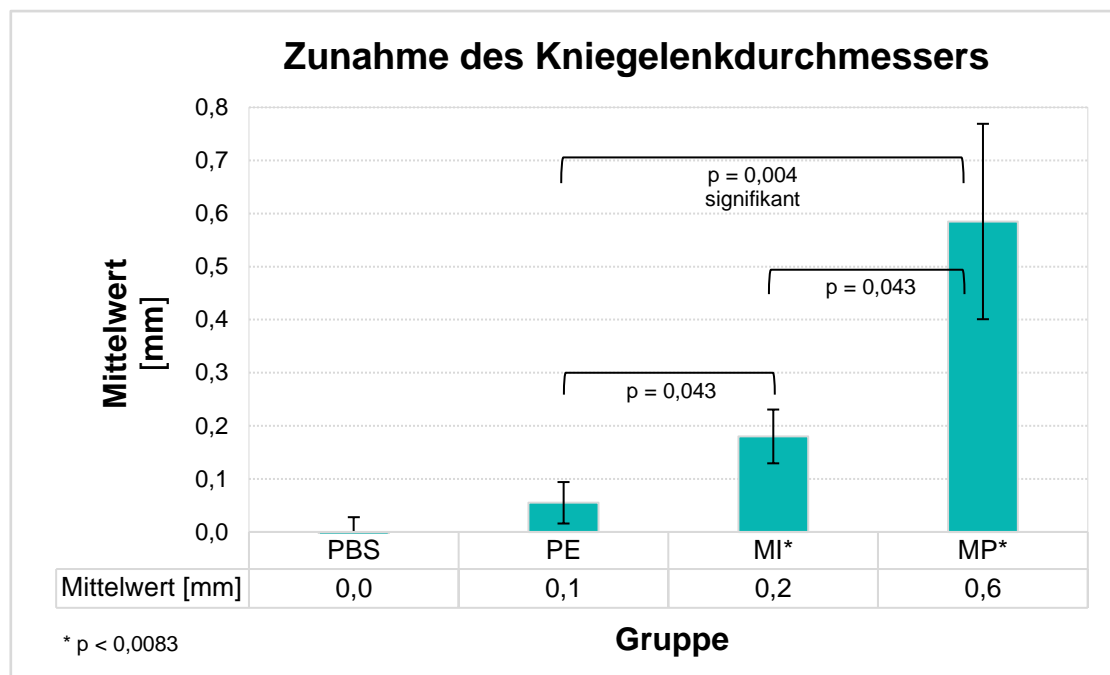


Abb. 13: Mittelwertvergleich der Differenz des Durchmessers des murinen Kniegelenks vor, sowie sieben Tage nach Injektion der entsprechenden Suspension/PBS

n = 10

* = signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (p < 0,0083)

⌈ ⌋ = Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen den verbundenen Gruppen

3.3. Intravitalmikroskopische Ergebnisse

3.3.1. Fraktion rollender Leukozyten

Bei der Messung der Fraktion rollender Leukozyten, wie in Abb. 15 und Abb. 16 bildlich dargestellt, zeigt sich ein deutlich signifikanter Anstieg jeweils nach der Injektion von Polyethylenpartikeln (MW $0,32 \pm \text{SEM } 0,012$; $p^* < 0,001$) und Metallpartikeln (MW $0,32 \pm \text{SEM } 0,016$; $p^* < 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (MW $0,20 \pm \text{SEM } 0,019$) (Abb. 14).

Wie in Abb. 14 dargestellt, unterscheidet sich die Fraktion der rollenden Leukozyten sieben Tage nach der Injektion von Metallionen (MW $0,22 \pm \text{SEM } 0,012$; $p = 0,190$) nicht signifikant von der PBS-Kontrollgruppe.

Die Reaktion auf Metallpartikel und Polyethylenpartikel ist ähnlich stark ausgeprägt ($p = 1,00$).

Die Fraktion rollender Leukozyten fiel in der Gruppe der Metallionen signifikant geringer als in der Metallpartikel- ($p < 0,001$) und in der Polyethylenpartikelgruppe ($p < 0,001$) aus.

Mittelwertvergleich Fraktion rollender Leukozyten

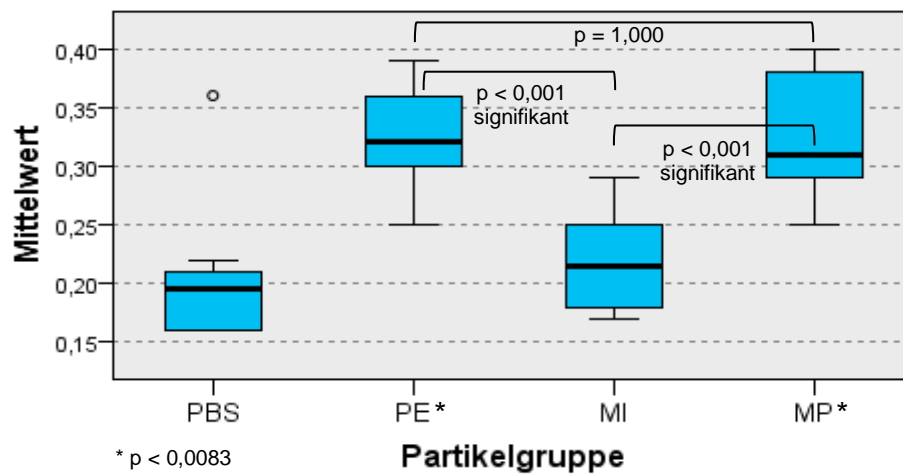


Abb. 14: Mittelwertvergleich der Fraktion rollender Leukozyten mit signifikanten Ergebnissen der Polyethylenpartikel- und der Metallpartikelgruppe gegenüber der Kontrollgruppe

$n = 10$, ° = Ausreißer

* = signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0.0083$)

— = Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen den verbundenen Gruppen

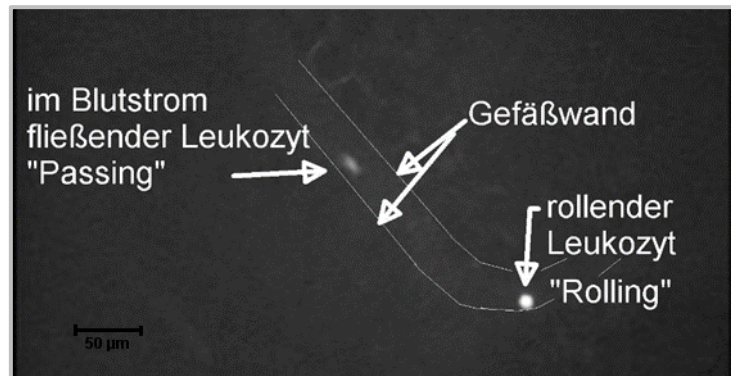


Abb. 15: Intravitalmikroskopische Darstellung eines Fluoreszenz-markierten intravasal rollenden Leukozyten. Die Gefäßwand wurde nachträglich zur besseren Sichtbarkeit nachgezeichnet [IrfanView, Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich].

Maßstab im Bild 50 μm .

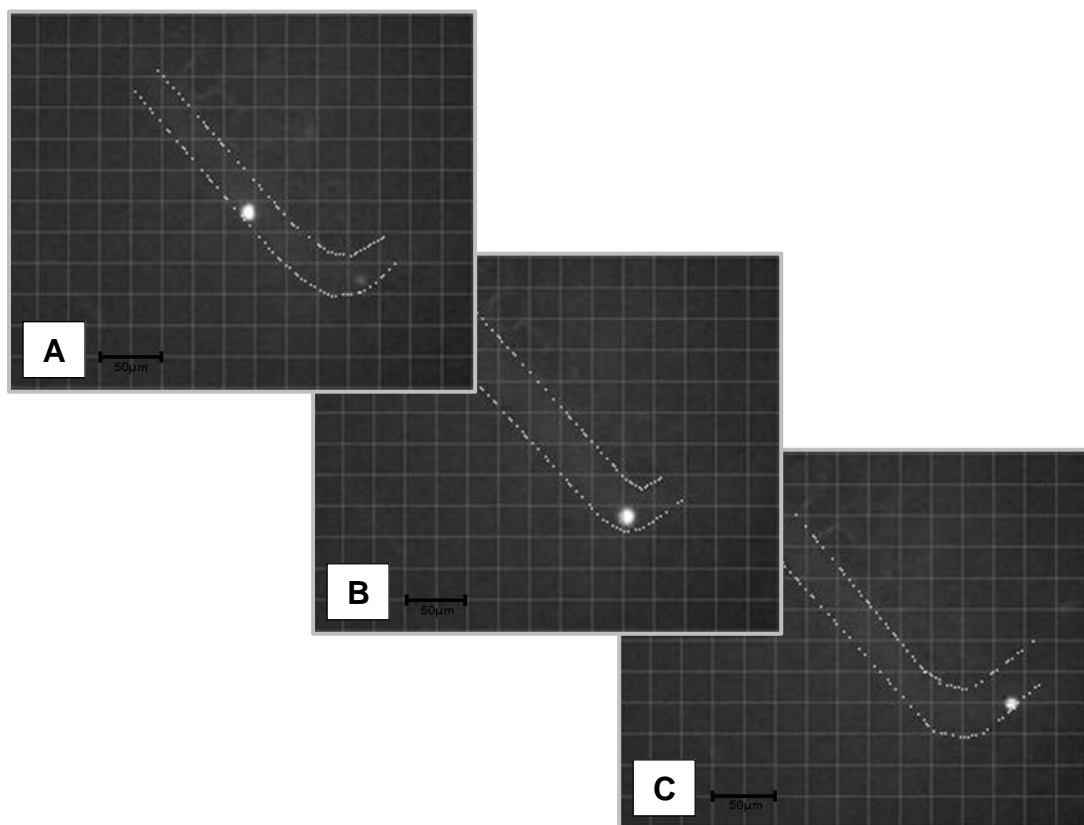


Abb. 16: Intravitalmikroskopische Darstellung eines Fluoreszenz-markierten intravasalen rollenden Leukozyten. Die Gefäßwand wurde nachträglich nachgezeichnet [IrfanView, Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich]. Maßstab im Bild 50 μm .

A: Aufnahmestart
 B: nach 17 Sekunden
 C: nach 27 Sekunden

3.3.2. Zahl adhärenter Zellen

Tendenziell nahm in der Metallpartikel- (MW $20,5 \pm \text{SEM } 4,8$; $p = 0,019$) und der Polyethylenpartikelgruppe (MW $11,8 \pm \text{SEM } 1,6$; $p = 0,043$) die Zahl der adhärenter Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (MW $8,2 \pm \text{SEM } 0,88$) zu (Abb. 17). Eine statistische Signifikanz ergab sich mit einem Bonferroni-korrigierten Signifikanzniveau von $p^* < 0,0083$ nicht.

Es wurde keine vermehrte Anzahl anheftender Leukozyten in der Gruppe der Metallionen (MW $5,1 \pm \text{SEM } 1,4$; $p = 0,123$) verglichen mit der Kontrollgruppe beobachtet (Abb. 17).

Nach der Injektion von Metallpartikeln und Polyethylenpartikeln kam es zu einer ähnlich großen Zunahme der adhärenter Zellen ($p = 0,190$).

Im Vergleich zur Reaktion auf Metallionen konnte in der Gruppe der Metallpartikel signifikant ($p = 0,002$) und der Polyethylenpartikel ($p = 0,009$) tendenziell höhere Zahlen adhärenter Zellen nachgewiesen werden.

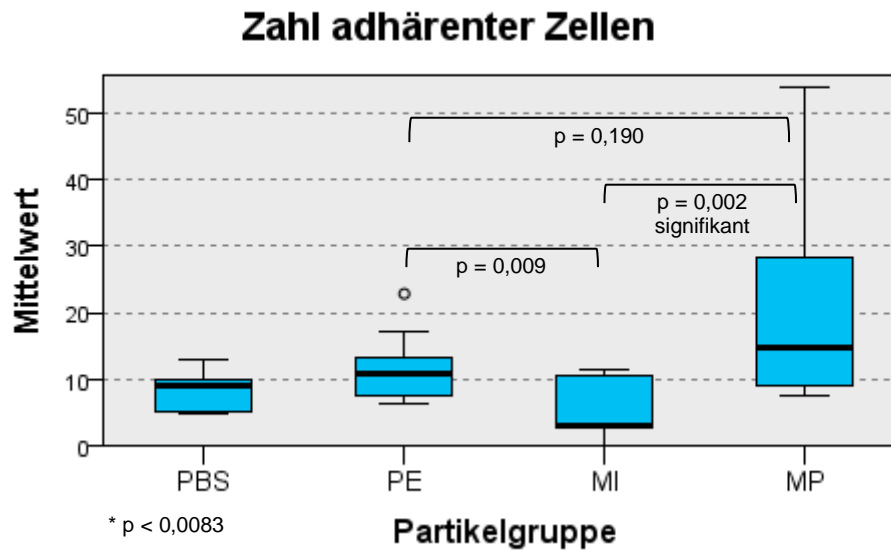


Abb. 17: Mittelwertvergleich der Zahl der adhärenter Zellen der Versuchsgruppen ohne signifikante Ergebnisse

$n = 10$, ° = Ausreißer

* = signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0083$)

— = Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen den verbundenen Gruppen

3.3.3. Flussgeschwindigkeit

Die Flussgeschwindigkeit innerhalb der untersuchten Gefäße nahm, wie in Abb. 18 ersichtlich, nach der Injektion der Abriebsuspension über alle Gruppen hinweg ab.

Eine signifikant verringerte mittlere Flussgeschwindigkeit wurde am deutlichsten in der Gruppe der Metallpartikel (MW $5,52 \pm \text{SEM } 0,30$; $p = 0,005$), gefolgt von der Polyethylenpartikelgruppe (MW $4,79 \pm \text{SEM } 0,18$; $p = <0,001$) im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe (MW $7,17 \pm \text{SEM } 0,32$) gezeigt.

Bei dem Vergleich der Metallionengruppe (MW $6,78 \pm \text{SEM } 0,50$; $p = 0,393$) mit der PBS-Kontrollgruppe konnte keine signifikant unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten gemessen werden.

Bei der Gegenüberstellung der einzelnen Suspensionsgruppen untereinander wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Materialien nachgewiesen ($p = 0,009$). Weder für den Vergleich der Polyethylenpartikel- mit der Metallionengruppe ($p = 0,01$), noch der Metallpartikel- und Polyethylenpartikelgruppe ($p = 0,123$) oder der Metallpartikel- und Metallionengruppe ($p = 0,063$) ergab sich eine signifikante Differenz in der Flussgeschwindigkeit (Abb. 18).

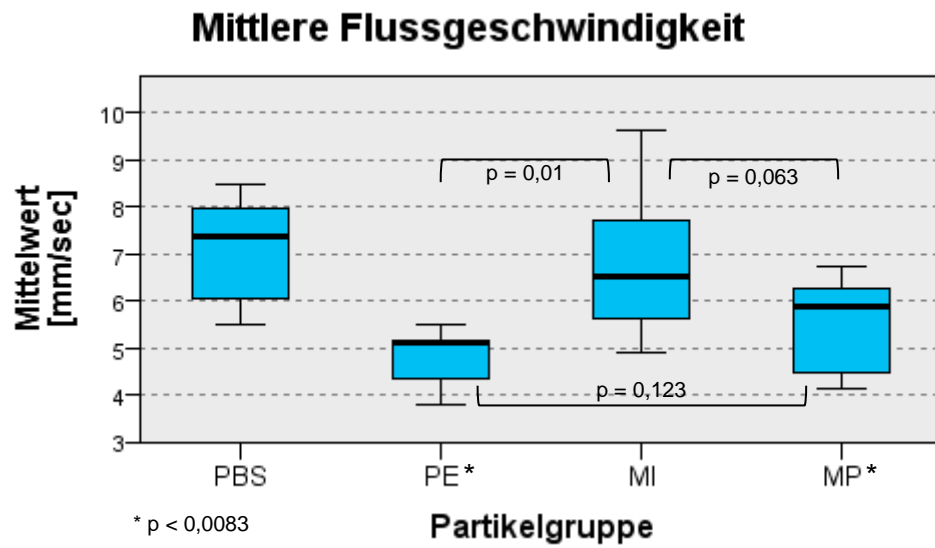


Abb. 18: Mittelwertvergleich der mittleren Flussgeschwindigkeit in Millimeter pro Sekunde in den untersuchten Gefäßen der Abriebgruppen

n = 10, ° = Ausreißer

* = signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (p < 0,0083)

— = Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen den verbundenen Gruppen

3.3.4. Funktionelle Kapillardichte

In Abb. 19 und Abb. 20 wird deutlich, dass die Injektion von Abriebsuspensionen gegenüber der PBS-Injektion der Kontrollgruppe zu einer Zunahme der funktionellen Kapillardichte geführt hat ($p = 0,003$).

Verglichen mit der Reaktion auf die Kontrollgruppe (MW $38,4 \frac{cm}{cm^2} \pm SEM 8,5 \frac{cm}{cm^2}$) konnte in der Polyethylenpartikelgruppe (MW $50,9 \frac{cm}{cm^2} \pm SEM 6,53 \frac{cm}{cm^2}$; $p = 0,003$) eine signifikante Zunahme der funktionellen Kapillardichte gezeigt werden. Tendenziell nimmt diese auch in der Metallpartikelgruppe (MW $45,6 \frac{cm}{cm^2} \pm SEM 3,87 \frac{cm}{cm^2}$; $p = 0,023$) zu, eine statistische Signifikanz mit Bonferroni-Korrektur $p^* < 0,0083$ wurde in dieser Gruppe nicht erreicht.

Die Kapillardichte der murinen Knie nach Injektion der Metallionen zeigte gegenüber der PBS-Kontrollgruppe keine signifikante Zunahme (MW $41,3 \frac{cm}{cm^2} \pm SEM 5,05 \frac{cm}{cm^2}$; $p = 0,247$).

Eine signifikant stärkere Zunahme der Kapillardichte wurde bei der Intravitalmikroskopie der Polyethylenpartikelgruppe im Vergleich zur Metallionengruppe nachgewiesen ($p = 0,007$).

Vergleicht man die Metallionen- und Metallpartikelgruppe miteinander, tendiert die Metallpartikelgruppe ohne Signifikanz zu einer größeren Zunahme der funktionellen Kapillardichte ($p = 0,035$).

Zwischen der Metallpartikel- und der Polyethylenpartikelgruppe wurde kein Unterschied gemessen ($p = 0,123$).

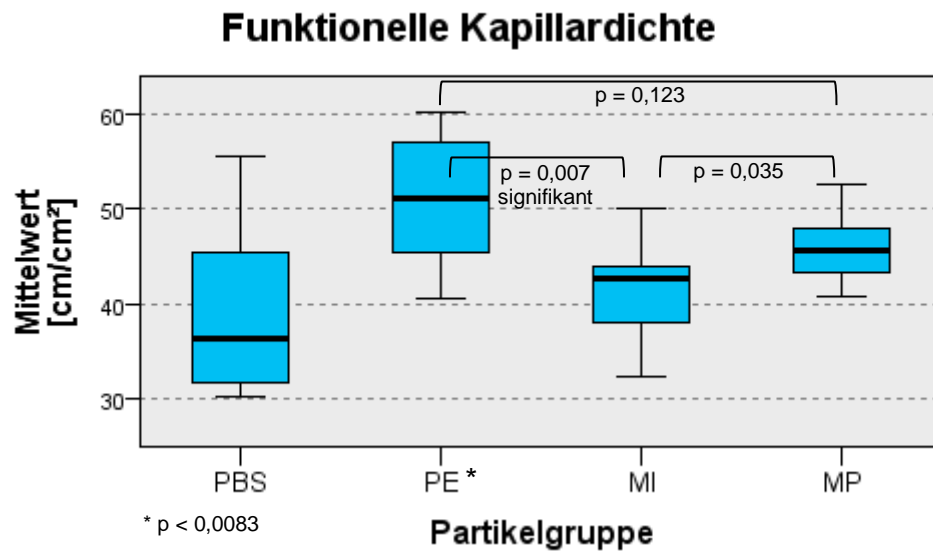


Abb. 19: Mittelwertvergleich der funktionellen Kapillardichte der Abriebgruppen in Zentimeter pro Quadratzentimeter

n = 10

* = signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (p < 0,0083)

— = Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen den verbundenen Gruppen

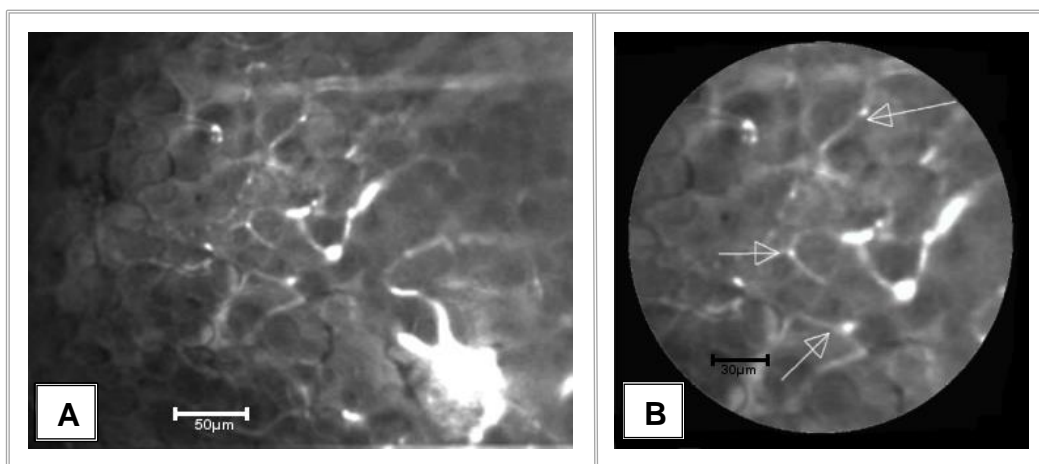


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der entzündlich erhöhten Kapillardichte mit Kontrastverstärkung durch FITC-Dextran (Auflichtmikroskop Axiotech Vario 100HD, Immersionsobjektiv Archoplan 20 x / 0,5 W)

A: Übersichtsaufnahme, Maßstab im Bild 50 µm.

B: Mit Pfeilen markierte Kapillaren und intrakapilläre Leukozyten in der Vergrößerung Maßstab im Bild 30 µm.

3.4. Histologische Ergebnisse

3.4.1. Histopathologischer Score nach Brackertz

Der Vergleich der, mit Hilfe des histopathologischen Scores nach Brackertz et al (154) ermittelten Inflammation ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Abriebgruppen und der PBS-Kontrollgruppe (MW $0,8 \pm 0,3$ SEM), was in Abb. 21 zur Darstellung kommt.

Der histopathologische Score nahm signifikant in der Metallpartikel-, (MW $3,6 \pm \text{SEM } 0,2$; $p^* < 0,001$), der Polyethylenpartikel- (MW $2,5 \pm \text{SEM } 0,2$; $p^* = 0,002$) und der Metallionengruppe (MW $2,3 \pm \text{SEM } 0,2$; $p^* = 0,003$) zu.

Nach der Injektion von Polyethylenpartikeln kam es im Vergleich zur Metallionengruppe zu einer ähnlich starken Zunahme des inflammatorischen Scores ($p = 0,481$).

Die histopathologisch gemessenen Reaktionen auf Metallpartikel war gegenüber der Reaktion auf Metallionen ($p = 0,001$) und Polyethylenpartikel ($p = 0,003$) signifikant größer.

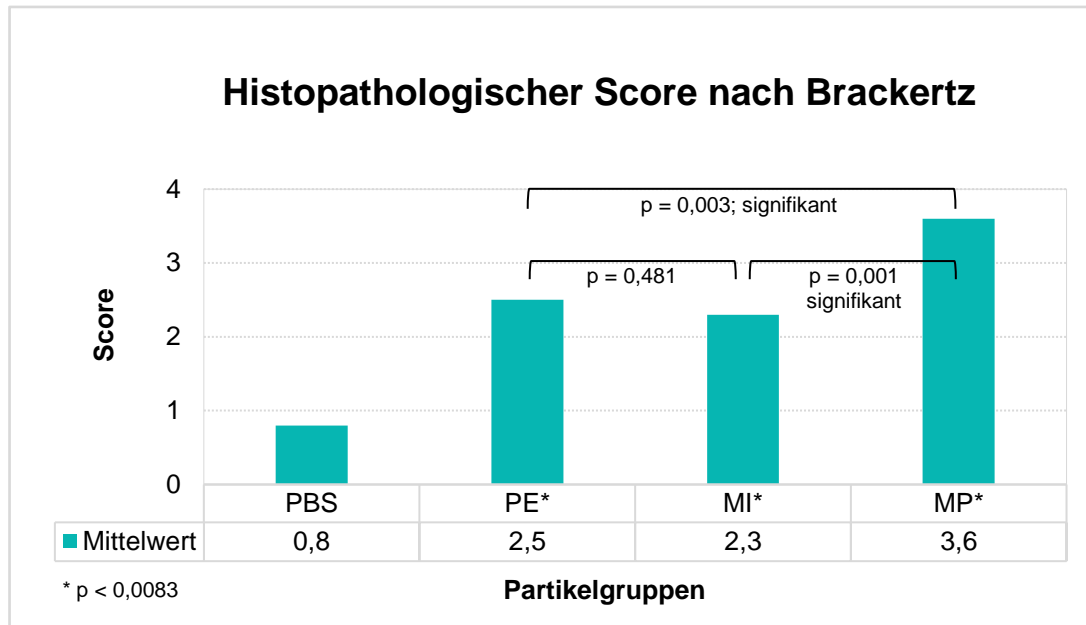


Abb. 21: Vergleich der Mittelwerte des histopathologischen Scores der Abriebgruppen mit der PBS-Kontrollgruppe

$n = 10$

* = signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0083$)

— = Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen den verbundenen Gruppen

3.4.2. Mittlere Synovialmembrandicke

Die Vermessungen der synovialen Membran ergab, wie aus Abb. 22 ersichtlich wird, eine signifikante Zunahme der Membrandicke verglichen mit der PBS-Kontrollgruppe (MW 14,57 $\mu\text{m} \pm \text{SEM } 3,3 \mu\text{m}$) über alle Abriebgruppen hinweg.

Die größte signifikante Proliferation der synovialen Membran zeigte die Versuchsgruppe nach der Injektion von Metallpartikeln (MW 187,3 $\mu\text{m} \pm \text{SEM } 44,4 \mu\text{m}$; $p^* < 0,001$). Deutlich zu sehen ist dies im HE-gefärbten histologischen Schnitt (Abb. 23 D). Die Reaktion auf Polyethylenpartikel (MW 46,8 $\mu\text{m} \pm \text{SEM } 7,1 \mu\text{m}$; $p^* < 0,001$) und Metallionen (MW 41,3 $\mu\text{m} \pm \text{SEM } 3,9 \mu\text{m}$; $p^* < 0,001$), abgebildet in Abb. 23 B und C, war ebenfalls signifikant stärker als die der Vergleichsgruppe. Untereinander war die verstärkte Proliferation der Synovialmembran beider Gruppen aber vergleichbar ausgeprägt ($p = 0,912$) (Abb. 22).

Die Metallpartikelgruppe reagierte verglichen mit der Metallionen- ($p = 0,003$) und Polyethylenpartikelgruppe ($p = 0,004$) mit einer signifikant proliferierten Synovialmembran (Abb. 22).

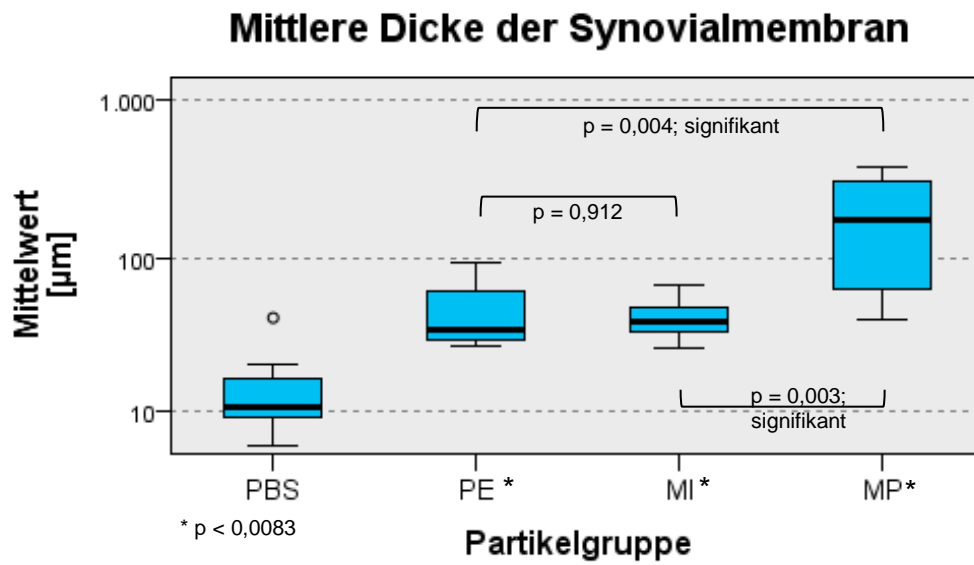


Abb. 22: Vergleich der Mittelwerte der mittleren Synovialmembrandicke in μm
 $n = 10$, ° = Ausreißer

* = signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0083$)

— = Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen den verbundenen Gruppen

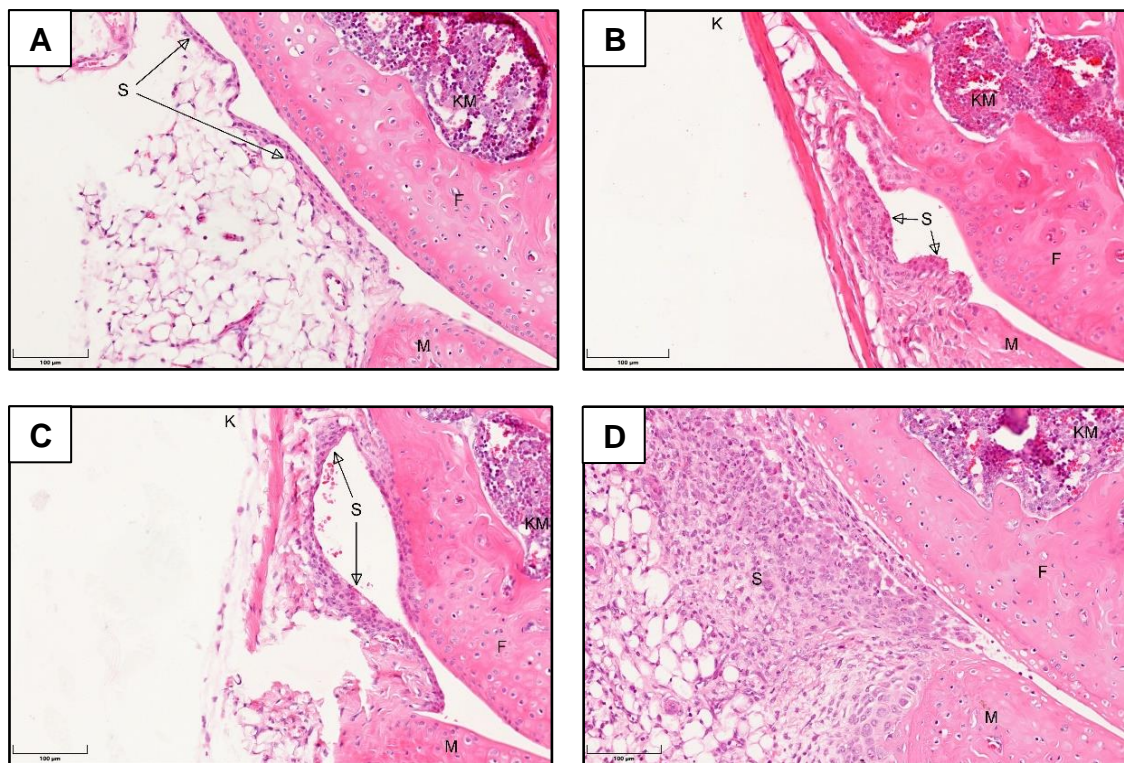


Abb. 23: Fokus auf die Reaktion der Synovialmembran (Pfeile, S) der HE-gefärbten Kniegelenke sieben Tage nach Injektion der jeweiligen Suspension

jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100µm

A: PBS: unauffällige Synovialmembran

B: PE: mäßig stark proliferierte Synovialmembran

C: MI: mäßig stark proliferierte Synovialmembran

D: MP: massiv proliferierte Synovialmembran

S = Synovialmembran; F = Femur; M = Meniskus; KM = Knochenmark; K = Kapsel

3.5. Deskriptive histologische Auswertung

Bei der Auswertung der histologisch gefärbten Präparate erfolgte eine deskriptive, qualitative Beurteilung der Kniegelenke.

Wie aus Abb. 24 hervorgeht, zeigte kein Kniegelenk der PBS-Kontrollgruppe histologische Auffälligkeiten, während in den Versuchsgruppen unterschiedliche qualitative Veränderungen zu erkennen waren.

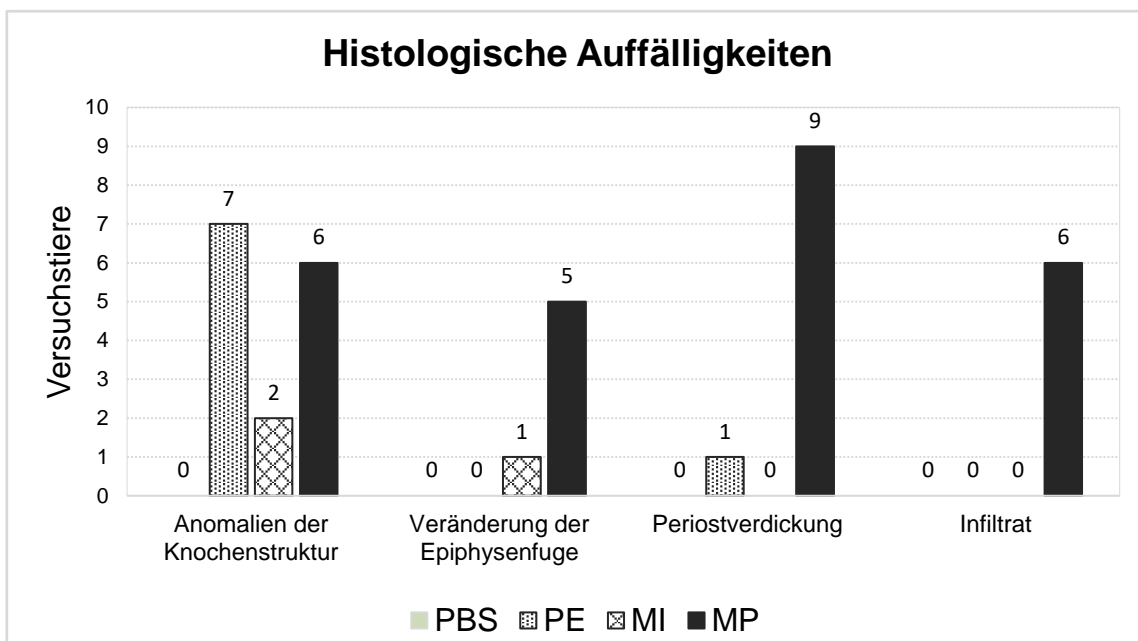


Abb. 24: Beobachtungen bei der Auswertung der histologisch gefärbten Präparate der Kniegelenke

n = 10

In Abb. 25 ist die unauffällige Synovialmembran der Kontrollgruppe mit Pfeilen gekennzeichnet. Die knöcherne Femur- und Tibiastruktur war in allen untersuchten murinen Knien erhalten und klar begrenzt, das Periost zeigte sich unauffällig schlank und nicht hyperplastisch konfiguriert. Auch an den Epiphysenfugen traten keine Strukturabweichungen auf.

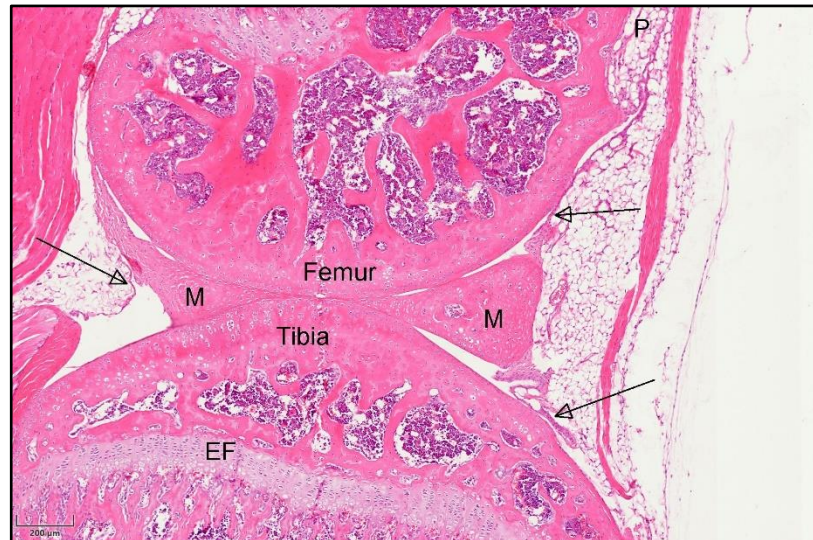


Abb. 25: murines Kniegelenk der Kontrollgruppe mit unauffälliger synovialer Membran (Pfeile) sieben Tage nach Injektion von PBS

Maßstab im Bild: 200µm, Vergrößerung: 50-fach, HE-Färbung

M = Meniskus; P = Periost; EF = Epiphysenfuge

Bei den Versuchstieren sieben Tage nach der Injektion von Polyethylenpartikeln wurde, wie in Abb. 26 mit Pfeilen markiert, proliferiertes Synovialgewebe nachgewiesen.

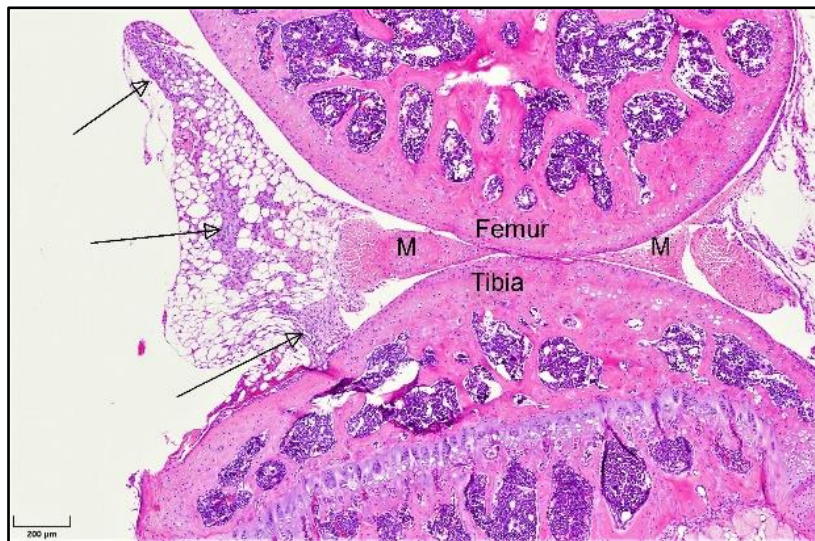


Abb. 26: murines Kniegelenk mit mäßig stark proliferierter synovialer Membran (Pfeile) sieben Tage nach Injektion von Polyethylenpartikeln

Maßstab im Bild: 200µm, Vergrößerung: 50-fach, HE-Färbung

M = Meniskus

Im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen und zur Kontrollgruppe (Abb. 24) fielen bei sieben der zehn Tiere aus der Polyethylenpartikelgruppe Anomalien der Knochenstruktur auf (Abb. 27, Pfeil). Die metaphysäre Kortikalis erschien aufgelockert und wies keine klare Begrenzung mehr auf. Bei einem Tier wurde zusätzlich eine Periostverdickung beobachtet (Abb. 27).

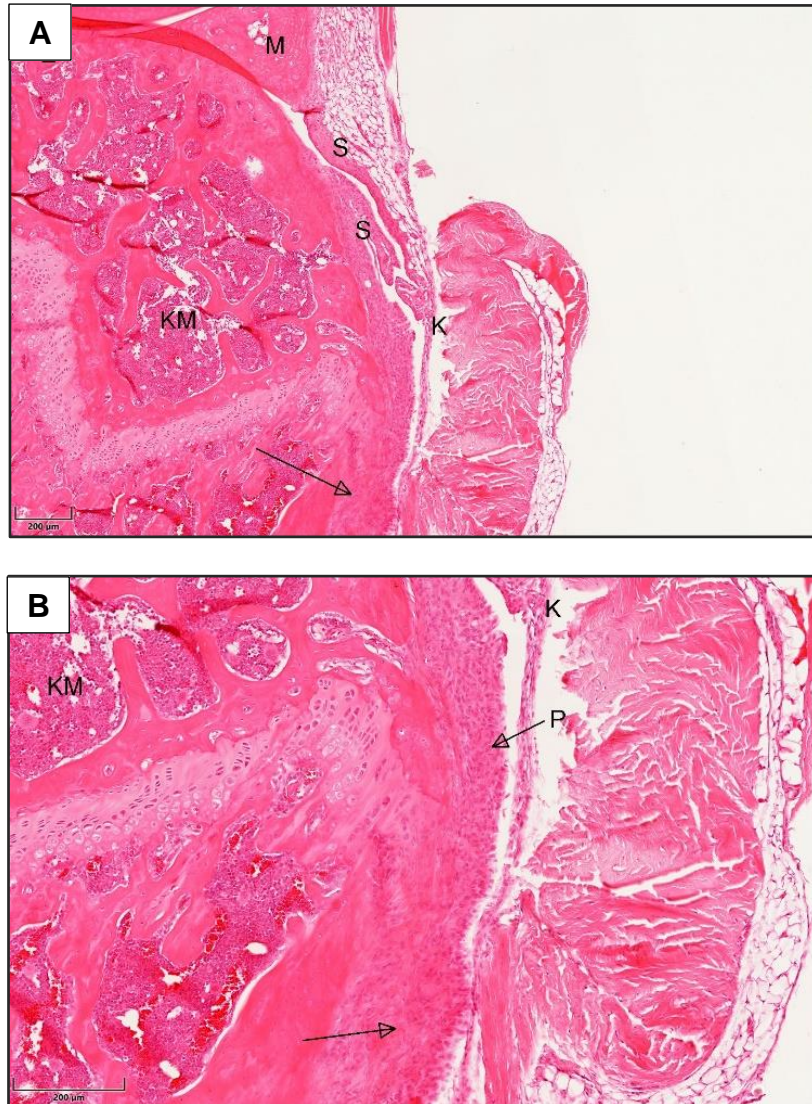


Abb. 27: ossäre Veränderungen (Pfeil) und Auflockerung der metaphysären Kortikalis sowie Proliferation des Periosts (Pfeil P) als Reaktion auf Polyethylenpartikel

A: 100-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 200 µm

B: 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100 µm

S = Synovia; P = Periost; M = Meniskus; KM = Knochenmark; K = Kapsel

Wie in Abb. 28 mit Pfeilen dargestellt, wurde in der Gruppe nach intraartikulärer Metallionen-Injektion ebenfalls eine Proliferation der synovialen Membran nachgewiesen.

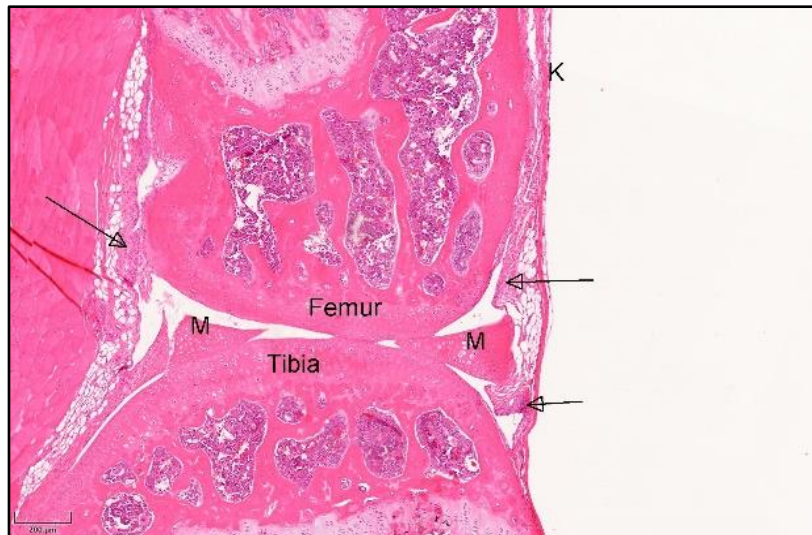


Abb. 28: murines Kniegelenk mit synovialer Membran (Pfeile) sieben Tage nach der Metallionen-Injektion

Maßstab im Bild: 200µm, 50-fache Vergrößerung, HE-Färbung

M = Meniskus, K = Kapsel

Bei einem einzelnen Versuchstier wurden zusätzlich sowohl Auffälligkeiten an der Epiphysenfuge (Pfeil Abb. 29 A/B), als auch Anomalien der Knochenstruktur festgestellt (*Pfeil Abb. 29 A/C). Wie in Abb. 24 dargestellt, reagierte ein weiteres Tier mit knöchernen Auffälligkeiten.

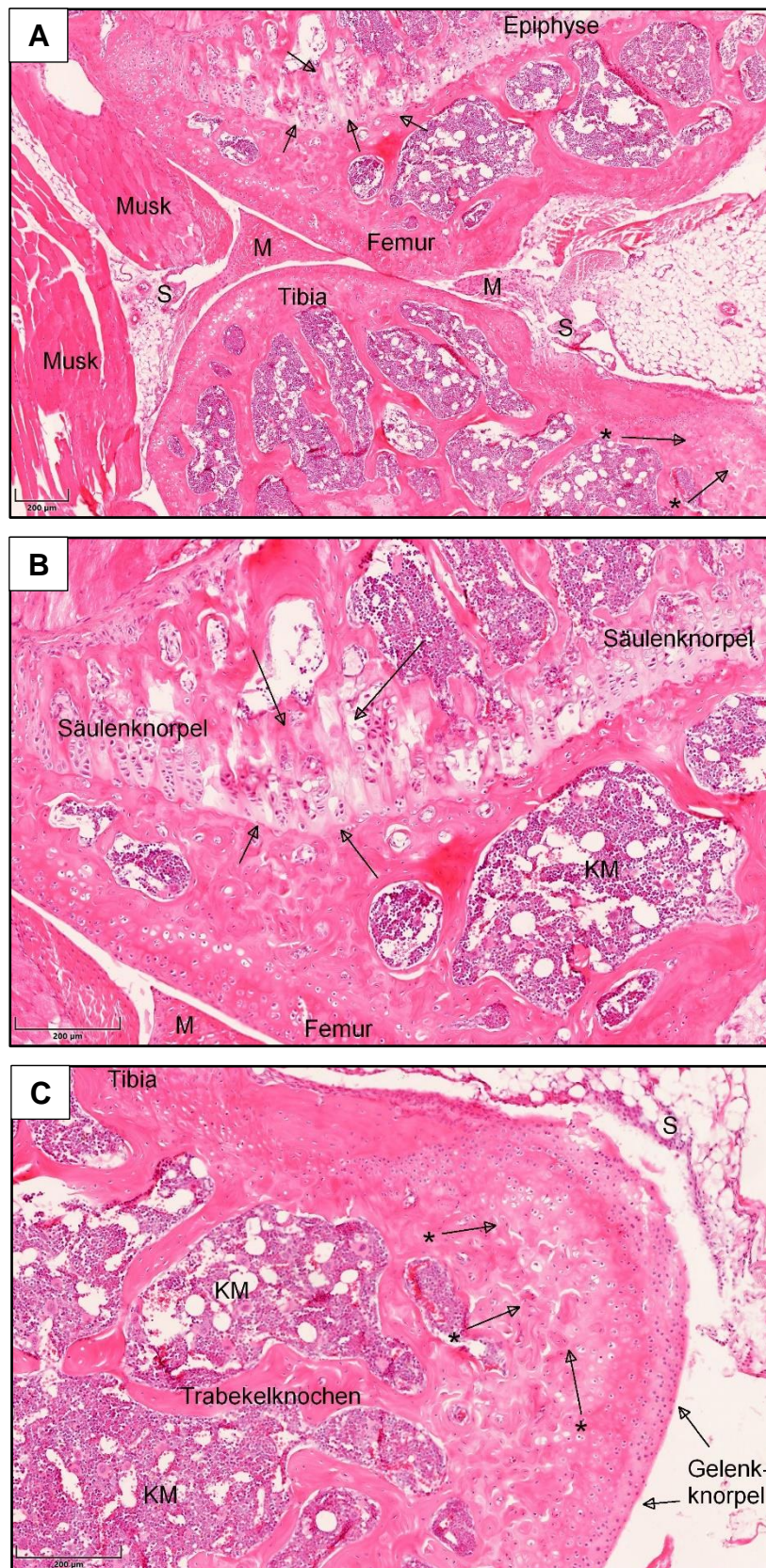


Abb. 29: murines Kniegelenk nach intraartikuläre Injektion von Metallionen mit Veränderung der Struktur der Epiphysenfuge (Pfeil) und Auffälligkeiten im subchondralen Knochen (* Pfeil)

A: Vergrößerung 50-fach, Maßstab im Bild: 200 µm

B: Vergrößerung: 100-fach, Maßstab im Bild: 200 µm

M = Meniskus; S = Synovia; Musk = Muskulatur; KM = Knochenmark

Insgesamt reagierten die Versuchstiere am deutlichsten auf Metallpartikel (Abb. 24). Neben der starken Reaktion der Synovialmembran auf die Metallpartikel (Abb. 30), fielen in dieser Gruppe vor allem Periostverdickungen (Abb. 32, Abb. 34) auf, die in neun der zehn Versuchstiere beobachtet werden konnten. Außerdem wurden veränderte Knochenstrukturen (Abb. 32), Veränderungen an den Epiphysenfugen (Abb. 33 Pfeil) und Infiltrate (Abb. 34) beobachtet.

In der Betrachtung der HE-gefärbten Präparate der Metallpartikelgruppe konnten lichtmikroskopisch Metallpartikel im Bereich der proliferierten Synovialmembran nachgewiesen werden (Abb. 30 A und B).

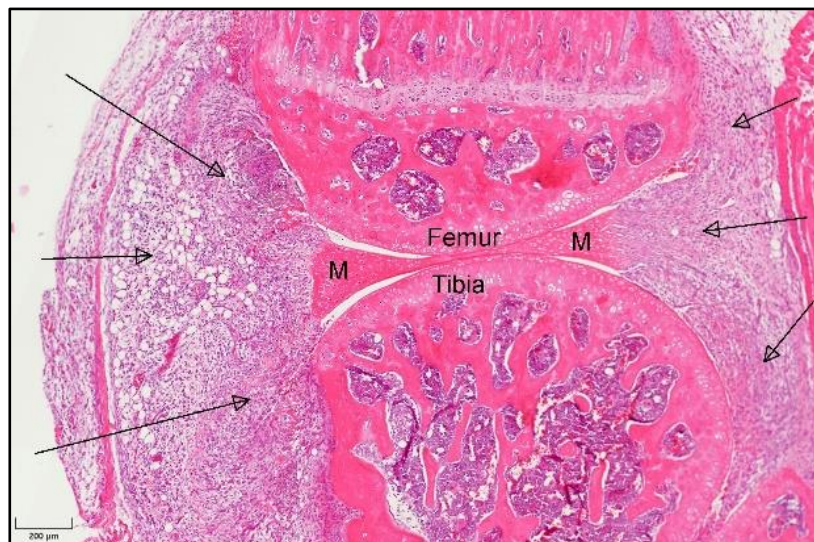


Abb. 30: murines Kniegelenk mit pseudotumorartig proliferiertem Synovialgewebe (Pfeile) sieben Tage nach der Injektion von Metallpartikeln

Maßstab im Bild: 200µm, 50-fache Vergrößerung, HE-Färbung

M = Meniskus

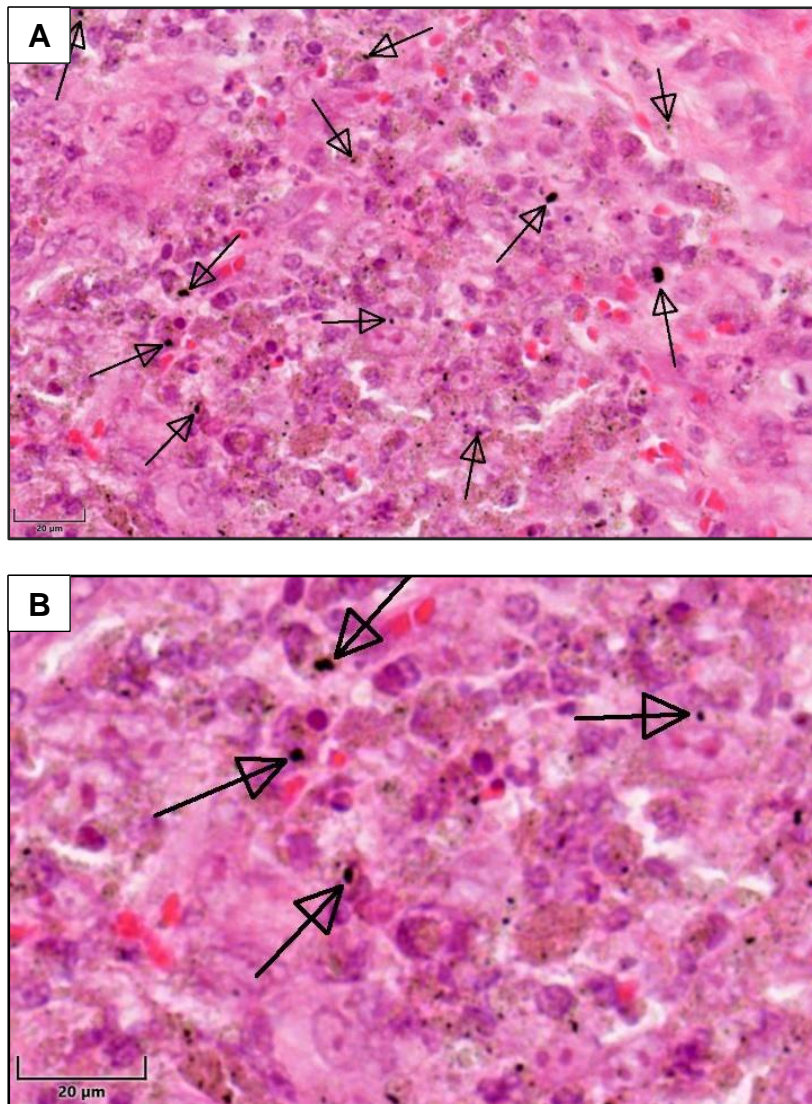


Abb. 31: abgelagerte Metallpartikel (z.T. mit Pfeil markiert) in der proliferierten Synovialmembran der Metallpartikelgruppe

A: Vergrößerung: 200-fach, Maßstab im Bild: 50 µm

B: Bildausschnitt mit mikroskopischer Vergrößerung: 630-fach, Maßstab im Bild: 20µm

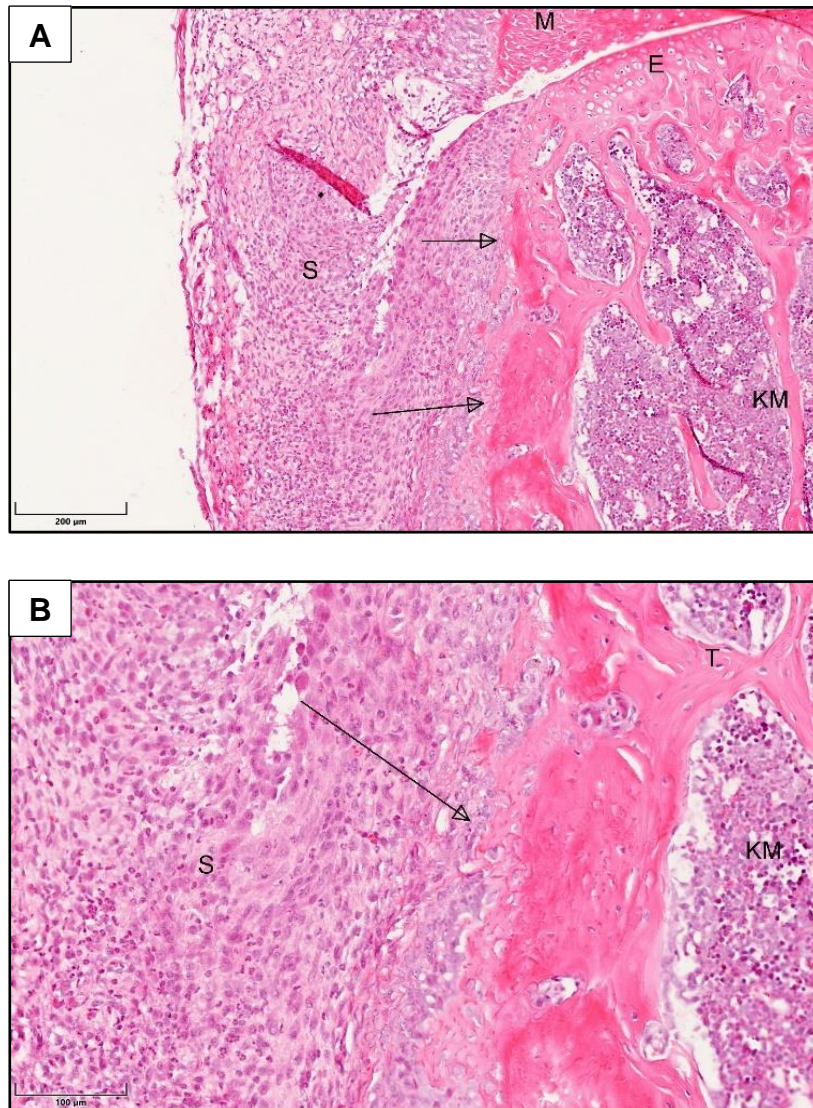


Abb. 32: Anomalien der Knochenstruktur mit Demarkation zwischen Kortikalis und Synovialgewebe (Pfeil) bei starker entzündlicher Reaktion der Synovialmembran (S) auf Metallpartikel

A: 100-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 200 µm

B: 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100 µm

S = Synovia; M = Meniskus; E: Epiphyse; KM = Knochenmark; T = Trabekel

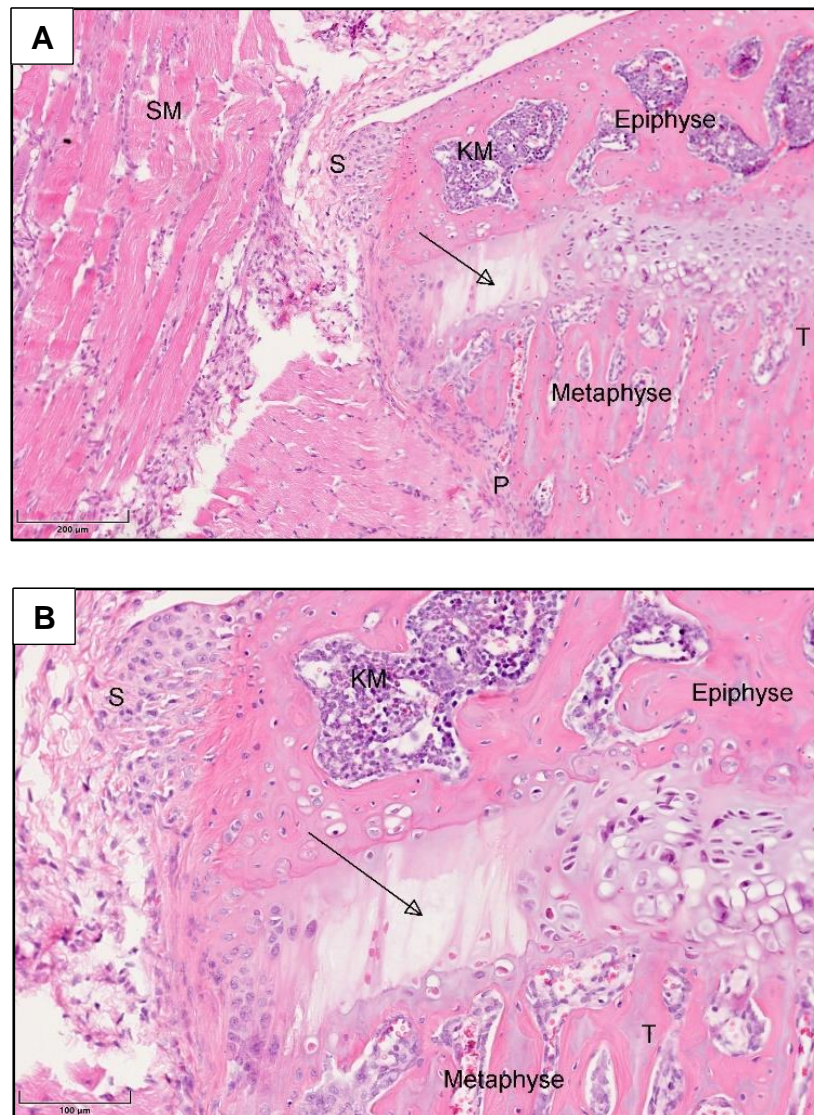


Abb. 33: Entkernte Zone (Pfeil) in der Epiphysenfuge sowie Periostverdickung (P) und entzündliche Synovialveränderung (S) in der Gruppe der Metallpartikel

A: 50-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 200 µm

B: 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100 µm

S = Synovia; KM = Knochenmark; P = Periost; SM = Skelettmuskel; T = Trabekel

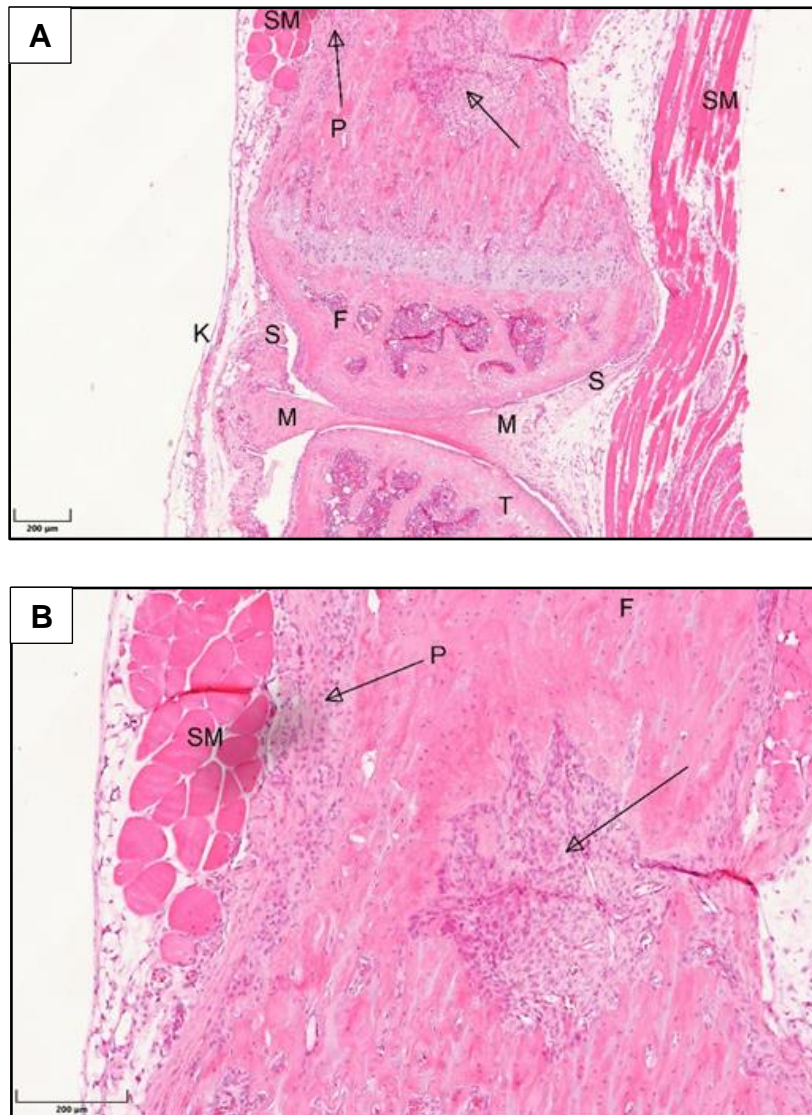


Abb. 34: Intraossäres Infiltrat (Pfeil) und inflammatorische Periostveränderungen (Pfeil P) in einem murinem Kniegelenk nach der Injektion von Metallpartikeln

A: 50-fache Vergrößerung; Maßstab im Bild: 200 µm
 B: 100-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 200 µm
 SM = Skelettmuskel; S: Synovia; P = Periost; K: Kapsel; F = Femur; T: Tibia

4. Diskussion

Der künstliche Hüftgelenkersatz ist ein etabliertes Verfahren zur Wiederherstellung der Mobilität und zur Verbesserung der Lebensqualität bei Patienten mit schwerer Arthrose oder periartikulären Femurfrakturen (45). Wenn in der Hüftendoprothetik beide Artikulationsflächen des Implantats aus einer Kobalt-Chrom-Molybdän (CoCrMo)-Legierung bestehen, nennt man diese Metall-auf-Metall-Endoprothesen. Sie können als Total-Endoprothesen oder Hüftkappenprothesen eingesetzt werden. Vor allem letztere waren bei jüngeren Patienten über längere Zeit das Implantat der Wahl (23, 155), da man von den guten tribologischen Eigenschaften überzeugt war und ein geringeres Verschleißprofil erwartete (155, 156). Die Hüftkappenprothese, die knochenschonendere Variante, bei der der Hüftkopf nicht entfernt, sondern überkront wird, hat im Vergleich zur Total-Endoprothese den entscheidenden Nachteil, dass die tribologische Fläche erheblich größer ist und damit einhergehend mehr Abrieb produziert wird (4, 156). Nach der Wiedereinführung dieser MoM-Gleitpaarungen wurde wegen der Produktion von sehr feinen Abriebteilchen und der Entstehung von reaktiven Kobalt- und Chrom-Ionen bald Bedenken laut (103, 157). Unerwünschte Reaktionen (adverse local tissue reactions oder ALTRs) auf die Abriebprodukte metallischer Oberflächen sind der häufigste Grund für Revisionsoperationen nach einem Oberflächengelenkersatz an der Hüfte und die Notwendigkeit für Revisionen ist, laut Studien der britischen Aufsichtsbehörde für Medizinprodukte und Produkte der Gesundheitsfürsorge bei Metall-auf-Metall-Endoprothesen, inakzeptabel häufiger, als bei anderen Gleitpaarungen (10, 45, 158). Pseudotumorähnliche periprotetische Gewebereaktionen um MoM-Hüft-Endoprothesen können Schmerzen verursachen und früh zu Revisionsoperationen führen, was besonders häufig bei MoM-Implantaten bei jüngeren Frauen auftrat (103, 159). Die hohen 5-Jahres-Revisionsraten und die zunehmenden Berichte dieser periprotetischen Pseudotumoren führten bald zu einem beschränkten Einsatz von Endoprothesen mit MoM-Gleitpaarungen (160).

Nachdem durch Analysen des National Joint Registry von England und Wales (JNR) die hohen Versagenszahlen der Prothesen bekannt wurden, nahmen sogar einige Händler ihre MoM-Prothesen-Modelle vom Markt (106, 161). Als populärstes Beispiel ist hier der US-Hersteller DePuy zu nennen, der bereits 2010 sein ASR™-Hüftsystem (Total-Endoprothese und Hüftkappenprothese) mit MoM-Gleitpaarung, freiwillig zurückrief (106, 110).

Obwohl die Implantationsprävalenz von MoM-Endoprothesen auf weniger als drei Prozent gesunken ist, gibt es derzeit noch fast eine Million Patienten, die künstliche Hüftgelenke mit einer MoM-Gleitpaarung tragen, was die aktuelle klinische Relevanz der Thematik zeigt (157).

Eine Vielzahl an Studien hat sich bislang vor allem mit den Eigenschaften von periprotetischem Materialabrieb beschäftigt oder sich auf die Messung von Serumionenspiegeln zur Abschätzung der Abriebmenge konzentriert (27, 34, 102, 162-164). Dies ist die erste Studie, in der *in vivo* das inflammatorische Potential von Metallionen und Metallpartikel getrennt voneinander betrachtet und mit Polyethylenpartikeln verglichen wird. Somit stellt diese Arbeit zusammen mit den weiteren Ergebnissen des DFG-Gemeinschaftsprojektes wichtige Bausteine zur Klärung der entzündlichen Reaktion bei der aseptischen Prothesenlockerung dar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sollen dabei helfen, die Folgen der Reaktion auf Metall-Abrieb, insbesondere bei MoM-Endoprothesen, aber auch bei anderen CoCrMo-enthaltenden Gleitpaarungen, abschätzen zu können. Ziel der Studie war zu diskriminieren, welchen Einfluss die Metallionen an der inflammatorischen Gesamtreaktion auf metallischen Abrieb im periartikulären Gewebe haben. Zusätzlich erfolgte der Vergleich des inflammatorischen Potentials zwischen Metallionen, Metallpartikeln und einer Polyethylenpartikel-gruppe sowie jeweils mit der PBS-Kontrollgruppe.

Die vor allem in den 2000er Jahren häufig implantierten Metall-auf-Metall-Endoprothesen haben in zahlreichen Fällen zur Bildung von pseudo-tumorösen Veränderungen und dadurch zu Revisionsoperationen geführt, weshalb es einer gründlichen Klärung der zugrundeliegenden Reaktion bedarf (44, 90, 103).

Die Anwendung eines *in vivo*-Modells zur Untersuchung der Reaktionen auf endoprothetisches Material hilft dabei, die Biokompatibilität der Materialien in einem komplexen Organismus zu untersuchen und ihre schädlichen Auswirkungen abzuschätzen. Hieraus ergab sich dieses Studiendesign, um *in vivo* das entzündliche Potential von Metallabrieb und Polyethylenabrieb zu bewerten. Verwendung fand ein Modell, das die Beobachtung und Quantifizierung der dynamischen Prozesse *in vivo* ermöglicht (141).

Das Inflammationsmodell mit einer Injektion der zu untersuchenden Suspension in den Gelenkspalt ermöglicht *in vivo* die Analyse des Leukozytenflussverhaltens und der Veränderung der Mikrovaskularisation (43, 141, 142, 165-167). Ursprünglich entwickelten Veihelmann et al. am Institut für Chirurgische Forschung der LMU (heutiges Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin) dieses Modell zur intravital-mikroskopischen Darstellung der Mikrozirkulation an der Maus für die Erforschung der Arthritis (141). Dieses wurde von Zysk et al. so modifiziert, dass mit diesem weiterentwickelten Modell erstmals inflammatorische Reaktionen auf Abriebpartikel von Endoprothesen untersucht wurden (141, 142). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Modell für die Diskriminierung der Reaktionsunterschiede auf unterschiedliche Materialien geeignet ist (141, 166).

Die gewählte Methode am murinen Kniegelenk ermöglicht die Charakterisierung der partikelinduzierten Entzündungsreaktion durch die Quantifizierung der Auswirkungen der Partikel auf die Mikrozirkulation und auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (142, 166). Zudem ist die anschließende histologische Untersuchung von Synovialgewebe und von periartikulärem Gewebe möglich.

Im Rahmen der Messung der mikrozirkulatorischen Parameter ist zu bedenken, dass das applizierte Volumen durch einen erhöhten Gewebedruck zur Beeinträchtigung des Blutflusses im Endstromgebiet führen könnte (141, 165).

Durch die Applikation von 50µl PBS in die Kniegelenke der Kontrollgruppen-Tiere, wurde der Einfluss des Flüssigkeitsvolumens bei der statistischen Auswertung der Reaktion auf die Suspensionen minimiert.

In dieser Studie wurde das murine Kniegelenk stellvertretend für das humane Hüftgelenk ausgewählt, da das Gelenk für die intraartikuläre Injektion und für die intravitalmikroskopische Untersuchung gut zugänglich ist (142, 166, 168). Über die Reaktion auf die Abriebbestandteile in einem mechanisch beanspruchten Gelenk und die direkte Einsehbarkeit des Gelenks entfaltet sich der entscheidende Vorteil dieser Methode, was die Situation im Körper nach dem Einsatz einer Endoprothese bestmöglich simulieren soll (142, 169).

Die gängigsten, in den letzten Jahrzehnten für die Erforschung der aseptischen Prothesenlockerung genutzten *in vivo*-Modelle, wurden für die untersuchte Fragestellung als weniger passend, im Vergleich zu der intraartikulären Injektion der Suspensionen bewertet. Hier unterscheidet man inflammatorische Modelle wie das Hautfalten-Kammer-Modell (170), das sogenannte „air pouch“ Modell (171-174), von osteolytischen Modellen wie beispielsweise dem Schädelkalottenmodell (175-179) und intramedullären Implantationsmodellen, welche die proximale Tibia-Hemiendoprothesen und distal femorale Implantate beinhalten (180-183).

Als Alternative zu der hier genutzten Methode, wurde das von Lehr et al. entwickelte Hautfalten-Kammer-Modell am Hamster zur intravital-mikroskopischen Messung der Mikrozirkulation in Granulationsgewebe oder von Gewebeimplantaten diskutiert (170, 184). Da hier zwar eine Messung der Mikrozirkulation möglich ist, diese jedoch gelenkfern erfolgt und damit kein Synovialgewebe beurteilt werden kann, wurde diese Option als weniger passend erachtet.

Wegen der ebenfalls fehlenden gelenkäquivalenten anatomischen Verhältnisse wurde für diese Studie das „air pouch“ Modell auch nicht ausgewählt. Nach mehrtägiger subkutaner Luftinjektion erfolgt bei dieser Methode die Partikelinjektion oder Implantation von Knochenstücken in die Luftkissen der Rückenhaut von Versuchsmäusen oder -ratten (171-174).

Weiterhin wird das Schädelkalottenmodell zur Messung von Knochenreaktionen und Knochenresorption eingesetzt. Dieses Modell ist zwar zur Beurteilung des Effekts der injizierten Partikel auf den Knochen gut geeignet, nicht aber für die Beurteilung der Inflammation (175-179). Die Versuche finden wie die beiden vorher beschriebenen Modelle gelenkfern statt, weshalb auch das Schädelkalottenmodell für die bearbeitete Fragestellung im Vergleich zu dem verwendeten *in vivo* Modell in seiner Aussagekraft in den Hintergrund rückt.

Die intramedullären Implantationsmodelle stellen die interessanteste Alternative zu dem hier gewählten Verfahren dar. Dem Versuchstier werden distal femorale Implantate oder proximal intramedulläre, lasttragende Tibia-Hemiendoprothesen eingesetzt und zusätzlich Partikel um das Implantat eingebracht (180, 181, 183). Mit dieser Variante können einzeitige Partikelimplantationen vorgenommen werden oder über subkutane Pumpen kontinuierlich intramedullär Partikel infundiert werden (180-183). Die Vorteile liegen bei diesem Ansatz in der artikulären Lokalisation und der kontinuierlichen Partikelfreisetzung, was dem Prozess im menschlichen Organismus näherkommt.

Dieses Modell wurde hauptsächlich hinsichtlich der korrekten Implantation der Materialien bei den gegebenen Größenverhältnissen hinterfragt (185). Wenn man sich beispielhaft den mittleren Kniegelenkdurchmesser von 4,3 mm bei den Versuchstieren der Studie vor Augen führt, ist kritisch zu beleuchten inwieweit eine adäquate Versorgung mittels Implantat mit gutem Sitz, ohne immenses Trauma und unter Erhalt der Gelenkintegrität möglich ist (185). Durch diesen komplexen Eingriff würde das Versuchstier zudem einer erheblichen längeren Operationsdauer und Narkosezeit ausgesetzt werden (183). Dies erachteten wir im Rahmen dieser Studie für die Versuchstiere als nicht erforderlich und zielführend.

In Summe kann mit der verwendeten intraartikulären Partikelinjektion die entzündliche Reaktion auf die applizierten Materialien gut dargestellt werden. Somit wurde das Modell für die vorliegende Fragestellung für geeignet empfunden.

Ein weiterer positiver Aspekt ist die langjährige Expertise der Arbeitsgruppe bei der Nutzung dieses inflammatorischen Modells (167, 185-187).

Im Rahmen eines statistischen Gutachtens wurde die Versuchstierzahl von $n=10$ je Gruppe festgelegt. Hier ergab sich das beste Verhältnis zwischen der statistischen Power und der ethisch zu rechtfertigenden Anzahl an Versuchstieren. Bei einer Gruppenstärke von $n=10$ ist nicht zu vernachlässigen, dass Individuen unterschiedlich auf prothetischen Abrieb reagieren (160). Dementsprechend war damit zu rechnen, dass innerhalb der Versuchsgruppen individuelle Unterschiede in der Reaktion auf die applizierten Suspensionen aufgetreten sind.

Das Zeitfenster von sieben Tagen wurde bereits in dem von Zysk et al. etablierten intravitalmikroskopischen Modell und in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe genutzt. Hier werden die, im Vergleich zum Menschen, schnelleren Stoffwechselprozesse berücksichtigt (142, 167, 186, 187). Die Wahl dieses Zeitraums wurde auch durch die Untersuchungen von Taki et al. anhand des murinen Schädelkalottenmodells untermauert. Hier traten nach fünf bis sieben Tagen bereits Osteolysen auf (188). Weiterhin deckt sich der Untersuchungszeitpunkt auch mit dem Zeitrahmen, der von den meisten Forschungsgruppen in etablierten *in vivo* Modellen gewählt wird (188-192).

Basierend auf diesen Recherchen wurde erneut die siebentägige Inkubationszeit für diese Studie gewählt. In anschließenden, weiterreichenden Studien könnte die inflammatorische Reaktion auch nach unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen untersucht werden, was in diesem Forschungsvorhaben nicht vorgesehen war. Hier wählten andere Forschungsgruppen beispielsweise Zeiträume von 3 und 6 Wochen (188, 193).

Als Ausgangspunkt für die zu applizierende Dosis orientierten wir uns an klinischen Untersuchungen, welche die Konzentrationen und Volumina von Abriebbestandteilen an Patientenmaterial gemessen haben (98). Die Idealsituation wäre die Durchführung einer Dosisfindungsstudie gewesen, die aus ethischen Gesichtspunkten bei diesem Stand unserer Forschung nicht möglich war. Hier wäre eine unverhältnismäßig große Menge an Versuchstieren von Nöten gewesen, die bei der aktuellen Fragestellung nicht vertretbar gewesen wäre.

Basierend auf Erfahrungen im Rahmen der Nutzung des etablierten Inflammationsmodells und analog zu der gewählten Konzentration der Polyethylenpartikel, wurde für die Applikation von Metallpartikeln die Konzentration von 0,1 Vol.-% gelöst in PBS gewählt (142, 186).

Die Wahl der Konzentration von Metallionen sollte möglichst nahe an die Werte in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit MoM-Endoprothesen kommen. Patienten, die aufgrund einer Symptomatik untersucht wurden, zeigten zum Teil maximale Kobalt- und Chromkonzentrationen über 1000 µg/l (148). Zellbiologische Studien innerhalb der Arbeitsgemeinschaft lösten bei solch hohen Werten zytotoxische Reaktionen aus (194). Eine von DeSmet et al. durchgeführte Analyse der Gelenkpunktate von Patienten mit Metall-auf-Metall-Hüft-Endoprothesen vor deren Revisions-eingriff ergab eine mediane Ionenkonzentrationen 200-250 µg/l (98). Da es nicht sinnvoll erschien, sich an der maximal gemessenen Ionen-Konzentration und damit eventuell an Ausreißern oder sogar Messfehlern zu orientieren, wählten wir für unser Modell die Metallionenkonzentration von 200 µg/l in PBS gelöst.

Inwieweit die im Patienten gemessenen Serum-Ionenkonzentrationen von Kobalt und Chrom mit den tatsächlichen intraartikulären Ionenkonzentrationen korrelieren, ist allerdings noch nicht abschließend geklärt (29, 98, 148).

Die Dosis der zu applizierenden Polyethylenpartikel bestimmten wir anhand des Partikelvolumens. Studien haben ergeben, dass das Partikelvolumen im Gegensatz zur Partikelanzahl kaum von der Größe der Partikel abhängig ist, womit man eine bessere Vergleichbarkeit der Resultate gewährleisten kann (134, 195-197).

Die gewählte Konzentration basiert auf Untersuchungen der Arbeitsgruppe Margevicius et al., in denen Abriebpartikelkonzentrationen untersucht wurden, die in Patienten mit gelockerten Endoprothesen und Pseudotumoren auftraten (198). Den dort beschriebenen Volumenanteil von 0,1 Vol.-% nutzte schon Zysk et al. für den hier genutzten Versuchsaufbau (142).

Utzschneider et al. konnten nachweisen, dass sich die inflammatorische Antwort von konventionellem sowie von quervernetztem Polyethylen intravitalmikroskopisch nicht signifikant unterscheidet (185), weshalb wir keine Änderung der Konzentration beim Wechsel von XLPE auf konventionelles UHMWPE vornahmen.

Durch die verbesserten Materialeigenschaften wird heute in der Regel als Gleitpaarungspartner anstatt des ultrahochmolekularen Polyethylens (UHMWPE) hauptsächlich hoch quervernetztes Polyethylen (XLPE) eingesetzt. Deshalb war bei unserer Studienplanung die Nutzung von XLPE vorgesehen.

Das angestrebte Ziel mit XLPE anstatt UHMWPE als Vergleichsgruppe zu arbeiten, scheiterte mutmaßlich daran, dass die benötigten Mengen an aufgereinigtem Polyethylenabrieb aus den verwendeten Hüftgelenks-simulatoren unseres Kooperationspartners Heidelberg nicht herstellbar waren. Was mit großer Wahrscheinlichkeit, übereinstimmend mit aktueller Literatur, an den deutlich geringeren Abriebraten des XLPEs im Vergleich zum UHMWPE liegen könnte (138, 140, 199).

Um trotzdem einen Vergleich der inflammatorischen Eigenschaften von Metallabrieb mit Polyethylenabrieb durchführen zu können, wurde auf industriell gefertigtes UHMWPE zurückgegriffen.

Zu den Unterschieden der Eigenschaften von konventionellem UHMWPE und XLPE wurden viele Untersuchungen durchgeführt. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass quervernetztes ultrahochmolekulares Polyethylen im Vergleich zu konventionellem UHMWPE eine deutlich höhere Verschleißfestigkeit aufweist und dadurch geringere Abriebraten mit sich bringt (200-203).

Im Zuge von Untersuchungen zur Biokompatibilität der beiden Werkstoffe wurden bei XLPE und UHMWPE *in vitro* abgesehen von Hochdosistests keine Unterschiede in den ausgelösten Reaktionen nachgewiesen (191, 204). Dagegen wurden in anderen Studien erhöhte TNF-alpha-Werte als Reaktion auf XLPE gemessen (17, 205). Dies könnte im Zusammenhang mit dem Nachweis kleinerer, stärker reaktiver Partikel im XLPE-Abrieb stehen (17, 43). In Patienten wurde bei der Nutzung von XLPE als Gleitpaarungspartner bei Hüft-TEPs in jüngeren Patienten langfristig weniger periprothetische Osteolysen und geringere Revisionsraten gezeigt als im Vergleich (206), was daraus schließen lassen könnte, dass die verminderte Abriebrate der XLPE mehr ins Gewicht fällt als die Effekte der eventuell reaktiveren Partikel.

Einen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie im Bereich des Polyethylens ist durch die Nutzung von UHMWPE-Partikeln anstatt XLPE-Partikeln nicht auszuschließen.

Für die mikroskopische Auswertung der HE-gefärbten histologischen Schnitte wurde das von Brackertz et al. entwickelte Scoring-System genutzt.

Dieser Bewertungsalgorithmus wurde bereits in einigen Vorarbeiten zu partikelinduzierten Gelenkreaktionen am murinen Knie genutzt. Er ist für die Einordnung der entzündlichen Veränderungen des Kniegelenks etabliert (142, 154, 166, 168).

Abweichend von der gängigen Praxis wurde nur ein repräsentativer Gewebeschnitt der jeweiligen Kniegelenke untersucht. Explizit wurde darauf geachtet, bei jedem Schnitt die gleiche Schnittebene durch das Kniegelenk zu untersuchen. Die Anzahl der gewählten Schnitte war deshalb limitiert, da für die nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen der murinen Kniegelenke innerhalb der Arbeitsgruppe viele Präparateschnitte benötigt wurden. Im Rahmen des Verständnisses der inflammatorischen Aktivität der Partikel und Ionen wog der Interessensgewinn durch die Messung der Matrixmetalloproteasen, Oberflächenantigene und Interleukine stärker als die Unterstützung der gewonnenen Ergebnisse durch weitere HE-Färbungen.

In der vorliegenden Studie wurde die inflammatorische Aktivität von Metallpartikeln, Metallionen und ultrahochmolekularem Polyethylen mit einer Kontrollgruppe *in vivo* verglichen.

Nach Auswertung der Ergebnisse aus Versuchen an dem etablierten Mausmodell (141, 142) konnten deutliche Unterschiede in der entzündlichen Aktivität der Materialien, vor allem in der histologischen Auswertung unter den gewählten Testbedingungen gezeigt werden.

Als ein klinischer Parameter wurde die makroskopische Vermessung der murinen Kniegelenkschwellung sieben Tage nach Injektion von Metallpartikeln, Metallionen, UHMWPE-Partikeln und der PBS-Lösung als Vergleichsgruppe herangezogen.

Die größte Schwellung der Kniegelenke zeigten die Versuchstiere nach der Applikation von Metallpartikeln. Die Knieschwellung präsentierte sich dabei mehr als doppelt so stark ausgeprägt, wie bei der Reaktion auf Metallionen. Dagegen reagierten die Versuchstiere auf Polyethylen und PBS mit keiner klinisch erfassbaren Kniegelenkschwellung. Da eine Schwellung ein klinischer Hinweis auf das entzündliche Geschehen ist (207), konnte aus dieser Beobachtung schon der erste Verdacht auf das vergleichsweise stärkere inflammatorische Potential der Metallpartikel gezogen werden.

Dass die Injektion selbst, sowie die Applikation von 50 µl Volumen keinen wesentlichen Einflussfaktor auf die Knieschwellung haben dürften, konnte durch das Ausbleiben der signifikanten Kniegelenkschwellung bei der Vergleichsgruppe mit PBS gezeigt werden. Gestützt wird diese Annahme durch die Untersuchungen von Zysk et al. zur Etablierung der gewählten Methode (142).

Die Gewebereaktion durch die applizierten Suspensionen wurde zusätzlich anhand der histologischen Bilder abgeleitet. Es erfolgte die Messung der Dicke der synovialen Membran und die Erhebung des Brackertz-Scores. Periostale Mitreaktionen gelten als ein weiteres Zeichen der Inflammation (208, 209).

Ein intravitalmikroskopisches Korrelat für entzündliche Prozesse sind die Migration von Leukozyten und die Vermehrung der Kapillaren innerhalb der Synovialmembran. Diese Zunahme der kapillären Dichte wird durch die gesteigerte Rekrutierung vorbestehender, nicht perfundierter Kapillaren und eine entzündliche Neovaskularisation erklärt (142, 150, 165). Der stärkste Zusammenhang zwischen der Applikation der zu untersuchenden Suspensionen und einer inflammatorischen Reaktion konnte in unserer Studie in der Gruppe der Metallpartikel verzeichnet werden. Die Exposition gegenüber Metallpartikel war mit einer deutlich erhöhten Proliferation der Synovialmembran und teilweise mit pseudotumor-ähnlicher Pannusbildung verbunden. Im Rahmen der starken Synovitis gab es dabei Zeichen für eine Destruktion des artikulären Knorpels und subchondralen Knochens. In der qualitativen Beurteilung der histologischen Präparate fielen in der Metallpartikel-Gruppe ausgeprägte ossäre und periostale Veränderungen sowie zellreiche Infiltrate auf, die am ehesten auf ein entzündliches Geschehen zurückzuführen sind.

Gestützt werden diese Ergebnisse durch die Veränderung der mikrozirkulatorischen Parameter der Metallpartikelgruppe, welche durch die intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfasst wurden. Vor allem präsentierte sich die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion der Gefäße der Synovialmembran verändert. Durch das vermehrte Rekrutieren der Leukozyten und einer tendenziell gesteigerten kapillären Dichte deuten auch die intravitalmikroskopischen Ergebnisse auf das Auslösen einer entzündlichen Reaktion durch Metallpartikel hin.

Die Ergebnisse der Studie legen den Schluss nahe, dass Metallpartikel dazu in der Lage sind, eine relevante inflammatorische Antwort zu induzieren.

Es ist bereits vielfach beschrieben, dass Metallabrieb das Potential besitzt, ausgeprägte Pseudotumor-ähnliche Veränderungen im umgebenden Weichteilmantel der Endoprothesen hervorzurufen (30, 33, 90, 103, 104). Durch den histologischen Nachweis der periprothetischen Gewebevermehrung als Reaktion auf Metallpartikel zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass Metallpartikel eine Schlüsselrolle bei der lokalen Gewebereaktion auf MoM-Endoprothesen einnehmen. Die starke biologische Aktivität von MoM-Abrieb wurde durch Topolovec et. al in Untersuchungen von Gewebeproben nach Revisionsoperationen von MoM- und MoP-Endoprothesen ebenfalls gezeigt.

Im periprothetischen Gewebe der MoM-Gruppe wurde dabei trotz niedrigerer Verschleißraten eine stärkere, lymphozytendominierte periprothetische Gewebereaktion im Vergleich zur MoP-Gruppe gezeigt (155).

In der Literatur wurde eine starke Assoziation zwischen der Ausbildung von Pseudotumoren und hohen Abriebraten beschrieben (39, 103, 155). Jedoch entwickeln nicht alle Patienten mit hohen Verschleißraten Pseudotumoren und nicht bei allen Patienten mit Pseudotumoren wurden erhöhte Abriebmengen nachgewiesen (39, 103). Bei einem Ausschluss von abriebbedingter periprothetischer Gewebevermehrung sollte eine Hypersensibilität gegen Metall in Betracht gezogen werden (103). Der Einfluss der Hypersensibilität wurde in dieser Arbeit nicht behandelt, da diese Thematik den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschreiten würde. Eine Hypersensibilität einzelner Versuchstiere auf Metallabriebprodukte stellt demnach einen möglichen Einflussfaktor auf die ausgelöste Reaktion dar.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine Minimierung des Verschleißes von Metall-auf-Metall-Hüftoberflächenersatz-Prothesen zu einer Verringerung der Inzidenz von Pseudotumoren führen würde. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine geringe Anzahl von Pseudotumoren trotzdem auftritt, was auf eine überschießende adaptive Immunantwort zurückführbar sein könnte (106).

In der histologischen Untersuchung der Kniegelenke nach der Exposition mit Metallionen zeigte sich eine mäßig starke Hyperplasie des Synovialgewebes und ein deutlich erhöhter inflammatorischer Score. Dies zeigt, dass auch Metallionen unabhängig von anderen Bestandteilen des metallischen Abriebs das Potential haben, eine relevante inflammatorische Reaktion auszulösen.

In der Intravitalmikroskopie wurde dagegen keine erhöhte Interaktion mit dem Leukozytenendothel und auch keine Veränderungen der kapillären Dichte beobachtet. Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass die inflammatorische Aktivität nicht unbedingt auf die leukozytäre Rekrutierung zurückzuführen ist. In weiteren Studien müsste hier der Pathomechanismus der Auslösung der entzündlichen Reaktion durch Metallionen weiter untersucht werden.

Die Ergebnisse der Studie im Hinblick auf die inflammatorische Aktivität der Metallionen deuten darauf hin, dass die Konzentration von freigesetzten periprotetischen Metallionen deutlich über der hier verwendeten Konzentration liegen müsste. Massenspektrometrisch wurde gezeigt, dass Metall-Partikel signifikante Mengen von Kobalt- und Chrom-Ionen in ein Kulturmedium freisetzen können (110). Posada et al. erforschte in einem *in vitro*-Versuch, dass Metallabrieb als Induktor der Apoptose wirksamer war, wenn die Zellen mit Kobalt-Ionen vorbehandelt worden waren (110). Außerdem korrelieren hohe Serum-Metallionenwerte bei Patienten mit Hüftkappenprothesen mit höheren Revisionsraten und einem häufigeren Auftreten von ALTRs (92). Aus der Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass durch die Ablösung von Metallpartikel von endoprothetischem Material Kobalt- und Chrom-Ionen entstehen und diese synergistisch eine starke periprotetische Reaktion auslösen. Was die schwere Gewebereaktion in der Metallpartikel-Gruppe mutmaßen lässt. Zu vermuten ist, dass die Metallpartikel intraartikulär korrodierten und damit zu einer Generierung größerer Mengen reaktiver Ionen geführt haben, was die deutliche lokale Inflammation bewirkt oder verstärkt haben könnte.

In der Metallionengruppe wurde bei der qualitativen Aufarbeitung der histologischen Präparate bei zwei der zehn Versuchstieren Auffälligkeiten in Form von einer Auflockerung der Knochenstruktur gefunden.

Das steht im Einklang mit *in vitro* Studien, in denen die zytotoxische Wirkung von Metallionen vor allem auf Osteozyten und auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen im Knochenmark gezeigt wurde (45, 114). Auch die Rostocker Arbeitsgruppe wies im Rahmen des Gemeinschaftsprojektes *in vitro* nach, dass Metallionen in humanen Osteoblasten in Co-Kultur mit peripheren mononukleären Blutzellen pro-osteolytische Mediatoren exprimieren (210). Unsere Studie bestätigte *in vivo* eine negative Wirkung der Metallionen am Knochen, die verglichen mit der Reaktion auf Metallpartikel jedoch weniger häufig beobachtet wurde und geringer ausgeprägt war. Hier besteht die Möglichkeit, dass die applizierte Metallionenkonzentration deutlich geringer war, als die Menge durch reaktive Metallpartikel freigesetzter Ionen. Es bleibt unklar, wie hoch die *in vivo* freigesetzte lokale Ionenkonzentration im Gewebe war.

Durch die Auswertung der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass metallischer Abrieb zur Ausbildung pseudotumoröser Veränderungen führen kann.

Anders als Metallpartikel, die hauptsächlich lokal von phagozytierenden Zellen internalisiert werden, haben gelöste Metallionen eine hohe Mobilität im menschlichen Körper (123, 211, 212). Dementsprechend können Effekte der Metallionen nicht nur in unmittelbarer Nähe der Freisetzung beobachtet werden, sondern vor allem auch in weiter entfernten Parenchymorganen, vorwiegend in der Niere, aber auch in Leber, Milz und Lunge nachgewiesen werden (47, 48, 111, 112, 213). Es besteht eine unklare Studienlage, ob Messungen von Metallionen-Spiegeln im Serum oder im Gelenkpunktat von Patienten mit dem Auftreten unerwünschter Gewebereaktionen korrelieren (214, 215). Das Einbeziehen der komplexen systemischen Reaktion auf Metallionen würde in der vorliegenden Arbeit zu weit führen. Die Untersuchung von diesem Aspekt erfolgt deshalb im Rahmen des Gemeinschaftsprojektes.

Die entzündliche Reaktion auf UHMWPE-Partikel präsentierte sich in der vorliegenden Studie durch eine moderate Proliferation der Synovialmembran und durch eine deutliche Erhöhung des inflammatorischen Scores in der histologischen Auswertung. Beides war erheblich geringer ausgeprägt, als in der Metallpartikelgruppe, aber verglichen mit der Reaktion auf Metallionen ähnlich stark und gegenüber der Kontrollgruppe deutlich signifikant.

Bisherige Studien ergaben, dass die Reaktivität von Polyethylen-Polymeren geringer ist als die Reaktivität von Metallabrieb (204, 216). Das deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie, in der die Polyethylenpartikel eine geringere inflammatorische Reaktion hervorriefen als die Metallpartikel. Interessanterweise war die Reaktion auf reine Metallionen etwas geringer ausgeprägt als auf das UHMWPE, was darauf schließen lässt, dass die gewählte Konzentration der Metallionen in ihrer inflammatorischen Aktivität mit dem verwendeten Polyethylen vergleichbar ist.

Aus den vorliegenden Ergebnissen könnte man mutmaßen, dass bei Patienten mit MoM- und MoP-Gleitpaarungen die entzündliche Reaktion zu einem größeren Teil von dem metallischen Abrieb verursacht wird.

Im Rahmen der qualitativen Beurteilung der histologisch gefärbten Kniegelenkpräparate fielen hauptsächlich ossäre Veränderungen auf. Diese präsentierten sich vor allem durch Auflockerungen der metaphysären Kortikalis. Das steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Studien, in denen die UHMWPE-Partikel zum Teil zu einer Induktion von Osteolysen bei Endoprothesen der Hüfte führten (43, 188).

Die Messergebnisse der Intravitalmikroskopie in der UHMWPE-Gruppe deuten ebenfalls durch vermehrte rollende Leukozyten und eine tendenziell erhöhte kapilläre Dichte auf das Auslösen einer inflammatorischen Reaktion durch Polyethylpartikel hin.

Unter Berücksichtigung der histologischen und intravitalmikroskopischen Ergebnisse können wir insgesamt also annehmen, dass UHMWPE-Partikel eine geringere inflammatorische Aktivität als metallischer Abrieb haben.

In Anbetracht der nachteiligen Auswirkungen von metallischem Abrieb der Endoprothesen auf das periprothetische Gewebe, implizieren die hier vorgestellten Ergebnisse, dass die Verwendung der CoCrMo-Legierungen für mechanisch belastete Gelenkflächen sorgfältig überdacht werden sollte. Hauptsächlich sollte auf Endoprothesen mit hohen Abriebraten, wie vor allem die MoM-Großkopfprothesen (121) verzichtet werden.

An dieser Stelle empfiehlt sich im Rahmen weiterführender Projekte eine Untersuchung der lokalen Freisetzung von Kobalt- und Chrom-Ionen nach Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen von Metallpartikeln.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der inflammatorischen Aktivität von metallischem Abrieb. Es wurde insbesondere der Einfluss von Metallionen auf die Gesamtreaktion im Vergleich zu der Reaktion auf Polyethylenpartikel in der Endoprothetik untersucht. Die Studie wurde vor dem Hintergrund des Auftretens von unerwünschten Gewebereaktionen und periprothetischen pseudo-tumorösen Veränderungen beim Einsatz von Metall-auf-Metall-Endoprothesen initiiert. Die Daten der vorliegenden Studie wurden anhand eines murinen *in vivo* Inflamationsmodells erhoben, das die entzündliche Aktivität von endoprothetischem Abrieb künstlicher Hüftgelenke abbildet.

Die intravitalmikroskopische Untersuchung und anschließende histologische Aufarbeitungen des murinen Gelenks brachte die entzündliche Reaktion auf Metallpartikel, Metallionen, Polyethylenpartikel und auf PBS als Kontrollgruppe zur Darstellung.

Die Ergebnisse der experimentellen Studie ergaben, dass Metallpartikel im vorliegenden Modell die stärksten Induktoren einer inflammatorischen Reaktion darstellten und in der Lage waren, pseudotumorähnliche Formationen auszubilden. Die Reaktion von Metallionen entsprach vor allem in den histologischen Untersuchungen etwa der Reaktion auf ultrahochmolekulargewichtige Polyethylenpartikel. Die Polyethylenpartikel lösten zudem noch osteolytische Veränderungen aus.

Die These, dass metallischer Abrieb eine deutliche inflammatorische Reaktion hervorruft, konnte bestätigt werden. Da die Metallionen in den letzten Jahren weiter in den Forschungsfokus gerückt sind, war die deutlich stärkere Reaktion der Metallpartikel im Vergleich zu den Metallionen unerwartet. Unklar bleibt hier, welchen Anteil der Reaktion auf Metallpartikel die lokale Bildung reaktiver Metallionen gespielt hat.

Aus den Ergebnissen konnte zudem geschlossen werden, dass Metallionen auch unabhängig von Metallpartikeln *in vivo* im Stande sind, eine entzündliche Reaktion hervorzurufen, was bedeutet, dass Metallpartikel nicht allein die periprothetische Reaktion auf metallischen Abrieb bedingen. Aus dieser Studie kann aber auch gefolgert werden, dass für das Auslösen schwerer Gewebereaktionen die Konzentrationen der freigesetzten Metallionen deutlich über der von uns gewählten Konzentration liegen müssten.

Zusammenfassend sollte das Ziel der Endoprothetik eine Vermeidung von Situationen mit großen Mengen von metallischem Abrieb sein. Ein kompletter Verzicht von Metall beim künstlichen Gelenkersatz ist heute aufgrund der guten Materialeigenschaften und der wirtschaftlichen Vorteile nicht realisierbar. Deshalb sollten vor allem Endoprothesen mit erhöhtem Metallabriebrisiko, wie beispielsweise MoM-Großkopfprothesen mit großer Tribofläche, zurückhaltend eingesetzt werden und deren Indikationen kritisch überdacht werden.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALTRs	Adverse local tissue reactions = unerwünschte Gewebereaktionen
ALVAL	aseptic lymphocytic vasculitis-associated lesion = aseptische lymphozytendominierte vaskulitische Läsion
CoCr	Kobalt-Chrom-Legierung
CoCrMo	Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCD	functional capillar density funktionelle Kapillardichte
FITC-Dextran	Fluoresceinisothiocyanat-Dextran
HE-Färbung	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HR-ICP-MS	High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry = Hochauflösende, induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie
MI	Metallionen
MoM	Metal-on-Metal = Metall-auf-Metall
MP	Metallpartikel
MW	Mittelwert
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung
PGE2	Prostaglandin E2
PMMA	Polymethylmetacrylat
SEM	Standard error of the mean Standardfehler des Mittelwerts
TEP	Totalendoprothese
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
UHMWPE	Ultra-high-molecular-weight polyethylene = Ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen
XLPE	Highly cross-linked polyethylene hoch quervernetztes Polyethylen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: prozentuale Revisionsrate primärer Hüft-Endoprothesen in den Jahren nach der Implantation (10)	- 2 -
Abb. 2.: Verteilung der Revisionsgründe für Totalendoprothesen in Prozent nach Daten des weltweiten Endoprothesen-Registers 2013 (15)	- 3 -
Abb. 3: Das Röntgenbild zeigt eine Versorgung der rechten Hüfte durch eine Kappenprothese	- 4 -
Abb. 4: Pseudotumor mit Pfeilen dargestellt in koronarem MRT mit Metall-Artefakt verminderter Sequenz ("MARS" - metal artifact reduction sequence) (42).....	- 5 -
Abb. 5: Aufbau des nativen Hüftgelenks (1)	- 7 -
Abb. 6: Röntgen Beckenübersichtsaufnahme mit Lockerung der Endoprothesen und ausgeprägten Osteolysezonen (Pfeil) mit freundlicher Genehmigung des Klinikums Großhadern	- 12 -
Abb. 7: schematische Darstellung einer Totalendoprothese (links) und einer Hüftkappenprothese (rechts) (1)	- 14 -
Abb. 8: zeitliche Veränderung der Prozentzahlen verschiedener Gleitpaarung unzementierter Totalendoprothesen nach Daten des weltweiten Endoprothesen-Registers X-Achse: Year of primary = Jahr der Primärendoprothetik..... Y-Achse: Percentage of uncemented primaries = Prozentsatz unzementierter Primärendoprothesen Lila: Uncemented MoP = unzementierte Metall-auf-Polyethylen-Gleitpaarung grau: Uncemented CoC = unzementierte Keramik-auf-Keramik-Gleitpaarung hellblau: Uncemented CoP = unzementierte Keramik-auf-Polyethylen-Gleitpaarung orange: Uncemented Mom = unzementierte Metall-auf-Metall-Gleitpaarung grün: Other/Unsure = Andere/unklare Gleitpaarung dunkelblau: Uncemented CoM = unzementierte Keramik-auf-Metall-Gleitpaarung (85)	- 15 -
Abb. 9: Intraartikuläre Injektion von 50 µl der Suspensionen	- 28 -
Abb. 10: Darstellung der Patellarsehne	- 29 -
Abb. 11: Darstellung von einem unbehandelten murinen Kniegelenk ohne inflammatorische Reaktion in HE-Färbung in 50-facher Vergrößerung, Maßstab im Bild: 200µm	- 35 -
Abb. 12: Darstellung der Gewichts Differenz in Gramm der Versuchstiere zwischen dem Tag der Injektion und dem Zeitpunkt der intravitalmikroskopischen Untersuchung (Tag 7)	- 41 -
Abb. 13: Mittelwertvergleich der Differenz des Durchmessers des murinen Kniegelenks vor, sowie sieben Tage nach Injektion der entsprechenden Suspension/PBS. -	43 -
Abb. 14: Mittelwertvergleich der Fraktion rollender Leukozyten mit signifikanten Ergebnissen der Polyethylenpartikel- und der Metallpartikelgruppe gegenüber der Kontrollgruppe	- 45 -

Abb. 15: Intravitalmikroskopische Darstellung eines Fluoreszenz-markierten intravasal rollenden Leukozyten. Die Gefäßwand wurde nachträglich zur besseren Sichtbarkeit nachgezeichnet [IrfanView, Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich].	- 46 -
Abb. 16: Intravitalmikroskopische Darstellung eines Fluoreszenz-markierten intravasalen rollenden Leukozyten. Die Gefäßwand wurde nachträglich nachgezeichnet [IrfanView, Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich]. Maßstab im Bild 50 µm.	- 46 -
Abb. 17: Mittelwertvergleich der Zahl der adhärenen Zellen der Versuchsgruppen ohne signifikante Ergebnisse	- 48 -
Abb. 18: Mittelwertvergleich der mittleren Flussgeschwindigkeit in Millimeter pro Sekunde in den untersuchten Gefäßen der Abriebgruppen	- 50 -
Abb. 19: Mittelwertvergleich der funktionellen Kapillardichte der Abriebgruppen in Zentimeter pro Quadratcentimeter	- 52 -
Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der entzündlich erhöhten Kapillardichte mit Kontrastverstärkung durch FITC-Dextran (Auflichtmikroskop Axiotech Vario 100HD, Immersionsobjektiv Archoplan 20 x / 0,5 W	- 52 -
Abb. 21: Vergleich der Mittelwerte des histopathologischen Scores der Abriebgruppen mit der PBS-Kontrollgruppe.	- 54 -
Abb. 22: Vergleich der Mittelwerte der mittleren Synovialmembrandicke in µm	- 56 -
Abb. 23: Fokus auf die Reaktion der Synovialmembran (Pfeile, S) der HE-gefärbten Kniegelenke sieben Tage nach Injektion der jeweiligen Suspension	- 57 -
Abb. 24: Beobachtungen bei der Auswertung der histologisch gefärbten Präparate der Kniegelenke n = 10	- 58 -
Abb. 25: murines Kniegelenk der Kontrollgruppe mit unauffälliger synovialer Membran (Pfeile) sieben Tage nach Injektion von PBS	- 59 -
Abb. 26: murines Kniegelenk mit mäßig stark proliferierter synovialer Membran (Pfeile) sieben Tage nach Injektion von Polyethylenpartikeln	- 60 -
Abb. 27: ossäre Veränderungen (Pfeil) und Auflockerung der metaphysären Kortikalis sowie Proliferation des Periosts (Pfeil P) als Reaktion auf Polyethylenpartikel	- 61 -
Abb. 28: murines Kniegelenk mit synovialer Membran (Pfeile) sieben Tage nach der Metallionen-Injektion	- 62 -
Abb. 29: murines Kniegelenk nach intraartikuläre Injektion von Metallionen mit Veränderung der Struktur der Epiphysenfuge (Pfeil) und Auffälligkeiten im subchondralen Knochen (* Pfeil)	- 63 -
Abb. 30: murines Kniegelenk mit pseudotumorartig proliferiertem Synovialgewebe (Pfeile) sieben Tage nach der Injektion von Metallpartikeln	- 64 -
Abb. 31: abgelagerte Metallpartikel (z.T. mit Pfeil markiert) in der proliferierten Synovialmembran der Metallpartikelgruppe	- 65 -

Abb. 32: Anomalien der Knochenstruktur mit Demarkation zwischen Kortikalis und Synovialgewebe (Pfeil) bei starker entzündlicher Reaktion der Synovialmembran (S) auf Metallpartikel	- 66 -
Abb. 33: Entkernte Zone (Pfeil) in der Epiphysenfuge sowie Periostverdickung (P) und entzündliche Synovialveränderung (S) in der Gruppe der Metallpartikel.....	- 67 -
Abb. 34: Intraossäres Infiltrat (Pfeil) und inflammatorische Periostveränderungen (Pfeil P) in einem murinem Kniegelenk nach der Injektion von Metallpartikeln	- 68 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histopathologischer Score nach Brackertz et al. (154).....	- 35 -
---	--------

Literaturverzeichnis

1. Steinkellner T. natives Hüftgelenk und Hüftgelenksendoprothese. Adobe Fotoshop CC2016.
2. Fuchs JRMS-NC. Prävalenz ausgewählter muskuloskelettaler Erkrankungen. Bundesgesundheitsblatt 2013. 2013;56:678–86.
3. Bundesamt S. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern. 2015.
4. Health Quality O. Metal-on-Metal Total Hip Resurfacing Arthroplasty: An Evidence-Based Analysis. Ontario Health Technology Assessment Series. 2006;6(4):1-57.
5. Rorabeck CH, Bourne RB, Laupacis A, Feeny D, Wong C, Tugwell P, et al. A double-blind study of 250 cases comparing cemented with cementless total hip arthroplasty. Cost-effectiveness and its impact on health-related quality of life. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1994(298):156-64.
6. Zywiol MG, Sayeed SA, Johnson AJ, Schmalzried TP, Mont MA. State of the art in hard-on-hard bearings: how did we get here and what have we achieved? Expert Review of Medical Devices. 2011;8(2):187-207.
7. Pabinger C, Geissler A. Utilization rates of hip arthroplasty in OECD countries. Osteoarthritis Cartilage. 2014;22(6):734-41.
8. Dickson FD. The Surgical Treatment of Arthritis. Annals of Surgery. 1941;113(5):869-76.
9. Crowninshield RD, Rosenberg AG, Sporer SM. Changing demographics of patients with total joint replacement. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2006;443:266-72.
10. Association AO. NATIONAL JOINT REPLACEMENT REGISTRY: Hip, Knee & Shoulder Arthroplasty - Annual Report. In: Health AGDo, editor. 2016. p. 25.
11. Daniel J, Pynsent PB, McMinn DJW. Metal-on-metal resurfacing of the hip in patients under the age of 55 years with osteoarthritis. Journal of Bone Joint Surgery, British Volume. 2004;86-B(2):177-84.
12. Malchau H, Herberts P, Eisler T, Garellick G, Soderman P. The Swedish Total Hip Replacement Register. Journal of Bone Joint Surgery, American Volume. 2002;84-A Suppl 2:2-20.
13. Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG, Nestor BJ, Sculco TP. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2007;454:251-61.
14. Man K, Jiang LH, Foster R, Yang XB. Immunological Responses to Total Hip Arthroplasty. Journal of Functional Biomaterials. 2017;8(3):33.

15. Sadoghi P, Liebensteiner M, Agreiter M, Leithner A, Bohler N, Labek G. Revision surgery after total joint arthroplasty: a complication-based analysis using worldwide arthroplasty registers. *The Journal of Arthroplasty*. 2013;28 (1532-8406 (Electronic)):1329-32.
16. Walker PS, Salvati E. The measurement and effects of friction and wear in artificial hip joints. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1973;7(3):327-42.
17. Fisher J, McEwen HM, Tipper JL, Galvin AL, Ingram J, Kamali A, et al. Wear, debris, and biologic activity of cross-linked polyethylene in the knee: benefits and potential concerns. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2004(428):114-9.
18. Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M. *AE-Manual der Endoprothetik - Hüfte und Hüftrevision*: Springer Berlin Heidelberg; 2012.
19. Mahalingam K, Reidy D. Smith-Petersen vitallium mould arthroplasty: a 45-year follow-up. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*. 1996;78-B(3):496-7.
20. Santavirta S, Bohler M, Harris WH, Konttinen YT, Lappalainen R, Muratoglu O, et al. Alternative materials to improve total hip replacement tribology. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 2003;74(4):380-8.
21. Weber BG, Fiechter T. Polyethylene wear and late loosening of a total prosthesis of the hip joint. New perspectives for metal/metal pairing of the capsule and head. *Orthopade*. 1989;18(5):370-6.
22. Long WT. The Clinical Performance of Metal-on-Metal as an Articulation Surface in Total Hip Replacement. *The Iowa Orthopaedic Journal*. 2005;25:10-6.
23. Heisel C, Silva M, Schmalzried TP. Bearing surface options for total hip replacement in young patients. *Instructional Course Lectures*. 2004;53(0065-6895 (Print)):49-65.
24. Clarke MT, Lee PT, Villar RN. Dislocation after total hip replacement in relation to metal-on-metal bearing surfaces. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 2003;85(5):650-4.
25. Roberts J, Meek RM, Roberts P, Grigoris P. Metal-on-Metal Hip Resurfacing. *Scottish Medical Journal*. 2005;50(1):10-2.
26. Amstutz HC, Grigoris P, Dorey FJ. Evolution and future of surface replacement of the hip. *Journal of Orthopaedic Science*. 1998;3(3):169-86.
27. Pandit H, Glyn-Jones S, McLardy-Smith P, Gundle R, Whitwell D, Gibbons CL, et al. Pseudotumours associated with metal-on-metal hip resurfacings. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 2008;90(7):847-51.
28. Ollivere B, Darrah C, Barker T, Nolan J, Porteous MJ. Early clinical failure of the Birmingham metal-on-metal hip resurfacing is associated with metallosis and soft-tissue necrosis. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 2009;91(8):1025-30.
29. Langton DJ, Jameson SS, Joyce TJ, Hallab NJ, Nattu S, Nargol AV. Early failure of metal-on-metal bearings in hip resurfacing and large-diameter total hip replacement: A

- consequence of excess wear. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 2010;92(1):38-46.
30. Ebrahimzadeh E, Campbell PA, Takamura KM, Lu Z, Sangiorgio SN, Kalma JJ, et al. Failure modes of 433 metal-on-metal hip implants: how, why, and wear. *Orthopedic Clinics of North America*. 2011;42(2):241-50, ix.
 31. Pandit H, Vlychou M, Whitwell D, Crook D, Luqmani R, Ostlere S, et al. Necrotic granulomatous pseudotumours in bilateral resurfacing hip arthroplasties: evidence for a type IV immune response. *Virchows Archiv*. 2008;453(5):529-34.
 32. Grammatopoulos G, Pandit H, Kwon YM, Gundle R, McLardy-Smith P, Beard DJ, et al. Hip resurfacings revised for inflammatory pseudotumour have a poor outcome. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 2009;91(8):1019-24.
 33. Kwon YM, Thomas P, Summer B, Pandit H, Taylor A, Beard D, et al. Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumors following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty. *Journal of Orthopaedic Research*. 2010;28(4):444-50.
 34. Kwon YM, Glyn-Jones S, Simpson DJ, Kamali A, McLardy-Smith P, Gill HS, et al. Analysis of wear of retrieved metal-on-metal hip resurfacing implants revised due to pseudotumours. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 2010;92(3):356-61.
 35. Campbell P, Doorn P, Dorey F, Amstutz HC. Wear and morphology of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles from total hip replacements. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*. 1996;210(3):167-74.
 36. Pandey R, Quinn J, Joyner C, Murray DW, Triffitt JT, Athanasou NA. Arthroplasty implant biomaterial particle associated macrophages differentiate into lacunar bone resorbing cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1996;55(6):388-95.
 37. Kraft CN, Burian B, Diedrich O, Wimmer MA. Implications of orthopedic fretting corrosion particles on skeletal muscle microcirculation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2001;12(10-12):1057-62.
 38. Asano T, Akagi M, Clarke IC, Masuda S, Ishii T, Nakamura T. Dose effects of cross-linking polyethylene for total knee arthroplasty on wear performance and mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007;83(2):615-22.
 39. Glyn-Jones S, Roques A, Taylor A, Kwon YM, McLardy-Smith P, Gill HS, et al. The in vivo linear and volumetric wear of hip resurfacing implants revised for pseudotumor. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 2011;93(23):2180-8.
 40. Latteier MJ, Berend KR, Lombardi AV, Jr., Ajluni AF, Seng BE, Adams JB. Gender is a significant factor for failure of metal-on-metal total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2011;26(6 Suppl):19-23.
 41. Cooper HJ, Ranawat AS, Potter HG, Foo LF, Jawetz ST, Ranawat CS. Magnetic Resonance Imaging in the Diagnosis and Management of Hip Pain After Total Hip Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*. 2009;24(5):661-7.
 42. Matthies AK, Skinner JA, Osmani H, Henckel J, Hart AJ. Pseudotumors are common in well-positioned low-wearing metal-on-metal hips. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2012;470(7):1895-906.

43. Catelas I, Wimmer MA, Utzschneider S. Polyethylene and metal wear particles: characteristics and biological effects. *Seminars in Immunopathology*. 2011;33(3):257-71.
44. Ebrahimzadeh E, Campbell P, Tan TL, Nelson SD, Sangiorgio SN. Can wear explain the histological variation around metal-on-metal total hips? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2015;473(2):487-94.
45. Rakow A, Schoon J, Dienelt A, John T, Textor M, Duda G, et al. Influence of particulate and dissociated metal-on-metal hip endoprosthesis wear on mesenchymal stromal cells in vivo and in vitro. *Biomaterials*. 2016;98:31-40.
46. Case CP, Langkamer VG, James C, Palmer MR, Kemp AJ, Heap PF, et al. Widespread dissemination of metal debris from implants. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 1994;76(5):701-12.
47. Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peoc'h M. Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 2000;82(4):457-76.
48. Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: A review of current knowledge and future strategies. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 2007;89(5):567-73.
49. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*: Georg Thieme Verlag; 2011.
50. Zippel J, Meyer-Ralfs M. Themistocles Gluck (1853-1942), pioneer in endoprosthetics. *Zeitschrift für Orthopädie und Ihre Grenzgebiete*. 1975;113(1):134-9.
51. Eynon-Lewis NJ, Ferry D, Pearse MF. Themistocles Gluck: an unrecognised genius. *BMJ*. 1992;305(6868):1534-6.
52. Hernigou P. Smith-Petersen and early development of hip arthroplasty. *International Orthopaedics*. 2014;38(1):193-8.
53. Halder AM, Stiehler M, Günther K-P. Historie und Epidemiologie. In: Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M, editors. *AE-Manual der Endoprothetik: Hüfte und Hüftrevision*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 1-20.
54. Konermann W, al. e. *Navigation und Robotik in der Gelenk- und Wirbelsäulenchirurgie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 2003:49-50.
55. Moore AT. Metal hip joint; a new self-locking vitallium prosthesis. *Southern Medical Journal*. 1952;45(11):1015-19.
56. Charnley J. ARTHROPLASTY OF THE HIP: A New Operation. *The Lancet*. 1961;277(7187):1129-32.
57. Wilson PD, Jr., Amstutz HC, Czerniecki A, Salvati EA, Mendes DG. Total hip replacement with fixation by acrylic cement. A preliminary study of 100 consecutive McKee-Farrar prosthetic replacements. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 1972;54(2):207-36.

58. McMinn D, Treacy R, Lin K, Pynsent P. Metal on metal surface replacement of the hip. Experience of the McMinn prosthesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1996(329 Suppl):S89-98.
59. Wiles P. The surgery of the osteoarthritic hip. *British Journal of Surgery*. 1958;45(193):488-97.
60. Charnley J. *Low Friction Arthroplasty of the Hip: Theory and Practice*: Springer Berlin Heidelberg New York; 1979.
61. Charnley J, Follacci FM, Hammond BT. The long-term reaction of bone to self-curing acrylic cement. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 1968;50(4):822-9.
62. McKee GK, Watson-Farrar J. Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 1966;48(2):245-59.
63. Jones LC, Hungerford DS. Cement disease. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1987(225):192-206.
64. Willert HG, Semlitsch M. Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1977;11(2):157-64.
65. Goldring SR, Schiller AL, Roelke M, Rourke CM, O'Neil DA, Harris WH. The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 1983;65(5):575-84.
66. Goldring SR, Jasty M, Roelke MS, Rourke CM, Bringhurst FR, Harris WH. Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface. Its role in bone resorption and implant loosening after total hip replacement. *Arthritis & Rheumatology*. 1986;29(7):836-42.
67. Sivash KM. The development of a total metal prosthesis for the hip joint from a partial joint replacement. *Reconstruction Surgery and Traumatology*. 1969;11:53-62.
68. Zweymuller K, Zhuber K, Locke H. A metal-ceramic composite endoprosthesis for total hip replacement (author's transl). *Wiener klinische Wochenschrift*. 1977;89(16):548-51.
69. Harris WH. Osteolysis and particle disease in hip replacement. A review. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1994;65(1):113-23.
70. Maloney WJ, Jasty M, Rosenberg A, Harris WH. Bone lysis in well-fixed cemented femoral components. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 1990;72(6):966-70.
71. Jasty M, Maloney WJ, Bragdon CR, Haire T, Harris WH. Histomorphological studies of the long-term skeletal responses to well fixed cemented femoral components. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 1990;72(8):1220-9.
72. NICE NifHaCE. Guidance on the Selection of Prostheses for Primary Total Hip Replacement. *British Journal of Perioperative Nursing*. 2000;10(6):285.

73. NICE NIfHaCE. Total hip replacement and resurfacing arthroplasty for end-stage arthritis of the hip. 2014:6.
74. van der Weegen W, Hoekstra HJ, Sijbesma T, Bos E, Schemitsch EH, Poolman RW. Survival of metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty: a systematic review of the literature. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 2011;93(3):298-306.
75. Toumbis CA, Kronick JL, Wooley PH, Nasser S. Total joint arthroplasty and the immune response. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1997;27(1):44-7.
76. Badarudeen S, Shu AC, Ong KL, Baykal D, Lau E, Malkani AL. Complications After Revision Total Hip Arthroplasty in the Medicare Population. *The Journal of Arthroplasty*. 2017;32(6):1954-8.
77. Jones LC, Frondoza C, Hungerford DS. Immunohistochemical evaluation of interface membranes from failed cemented and uncemented acetabular components. *J Biomed Mater Res*. 1999;48(6):889-98.
78. Stea S, Visentin M, Granchi D, Cenni E, Ciapetti G, Sudanese A, et al. Apoptosis in peri-implant tissue. *Biomaterials*. 2000;21(13):1393-8.
79. Yang F, Wu W, Cao L, Huang Y, Zhu Z, Tang T, et al. Pathways of macrophage apoptosis within the interface membrane in aseptic loosening of prostheses. *Biomaterials*. 2011;32(35):9159-67.
80. Catelas I, Petit A, Zukor DJ, Marchand R, Yahia L, Huk OL. Induction of macrophage apoptosis by ceramic and polyethylene particles in vitro. *Biomaterials*. 1999;20(7):625-30.
81. Goodman SB, Ma T. Cellular chemotaxis induced by wear particles from joint replacements. *Biomaterials*. 2010;31(19):5045-50.
82. Heneghan C, Langton D, Thompson M. Ongoing problems with metal-on-metal hip implants. *BMJ*. 2012;344:e1349.
83. Amstutz HC, Campbell P, Kossovsky N, Clarke IC. Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1992(276):7-18.
84. Charnley J. Total prosthetic replacement of the hip. *Triangle*. 1968;8(6):211-6.
85. Malviya A, Abdul N, Khanduja V. Outcomes Following Total Hip Arthroplasty: A Review of the Registry Data. *Indian Journal of Orthopaedics*. 2017;51(4):405-13.
86. Jacobs JJ, Skipor AK, Patterson LM, Hallab NJ, Paprosky WG, Black J, et al. Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 1998;80(10):1447-58.
87. Amanatullah DF, Sucher MG, Bonadurer GF, 3rd, Pereira GC, Taunton MJ. Metal in Total Hip Arthroplasty: Wear Particles, Biology, and Diagnosis. *Orthopedics*. 2016:1-9.
88. Zylka-Menhorn V. Metall-Hüftendoprothesen: Was Ärzte Patienten raten können. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2012:708-9.

89. Smith AJ, Dieppe P, Howard PW, Blom AW, National Joint Registry for E, Wales. Failure rates of metal-on-metal hip resurfacings: analysis of data from the National Joint Registry for England and Wales. *Lancet*. 2012;380(9855):1759-66.
90. Fehring TK, Odum S, Sproul R, Weathersbee J. High frequency of adverse local tissue reactions in asymptomatic patients with metal-on-metal THA. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2014;472(2):517-22.
91. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Koster G, et al. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 2005;87(1):28-36.
92. Laaksonen I, Donahue GS, Madanat R, Makela KT, Malchau H. Outcomes of the Recalled Articular Surface Replacement Metal-on-Metal Hip Implant System: A Systematic Review. *Journal of Arthroplasty*. 2017;32(1):341-6.
93. Svensson O, Mathiesen EB, Reinholt FP, Blomgren G. Formation of a fulminant soft-tissue pseudotumor after uncemented hip arthroplasty. A case report. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 1988;70(8):1238-42.
94. Mak KH, Wong TK, Poddar NC. Wear debris from total hip arthroplasty presenting as an intrapelvic mass. *J Arthroplasty*. 2001;16(5):674-6.
95. Walsh AJ, Nikolaou VS, Antoniou J. Inflammatory pseudotumor complicating metal-on-highly cross-linked polyethylene total hip arthroplasty. *Journal of Arthroplasty*. 2012;27(2):324 e5-8.
96. Haddad FS, Thakrar RR, Hart AJ, Skinner JA, Nargol AV, Nolan JF, et al. Metal-on-metal bearings: the evidence so far. *Journal of Bone Joint Surgery, British Volume*. 2011;93(5):572-9.
97. Zhang X, Li Q, Lin L, Liu C, Li G. Chronic exposure to trace chromium induces oxidative stress in mouse liver cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2012;32(7):1031-6.
98. De Smet K, De Haan R, Calistri A, Campbell PA, Ebrahimzadeh E, Pattyn C, et al. Metal ion measurement as a diagnostic tool to identify problems with metal-on-metal hip resurfacing. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 2008;90 Suppl 4:202-8.
99. Varnum C. Outcomes of different bearings in total hip arthroplasty - implant survival, revision causes, and patient-reported outcome. *Danish Medical Journal*. 2017;64(3).
100. Unsworth-Smith T, Khan JC, Khan RJK, Chelva E, Lim CA, Haebich S, et al. Impact of Raised Serum Cobalt Levels From Recalled Articular Surface Replacement Hip Prostheses on the Visual Pathway. *The Journal of Arthroplasty*. 2017;32(10):3147-51.
101. Kiran M, Armstrong C, Shivarathre D, Peter VK. Blood Metal Ion Levels Have Limited Utility in the Surveillance of Asymptomatic Large-Head Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasties. *The Journal of Arthroplasty*. 2017.

102. Hartmann A, Hannemann F, Lutzner J, Seidler A, Drexler H, Gunther KP, et al. Metal ion concentrations in body fluids after implantation of hip replacements with metal-on-metal bearing--systematic review of clinical and epidemiological studies. *PLoS One*. 2013;8(8):e70359.
103. Campbell P, Ebrahimzadeh E, Nelson S, Takamura K, De Smet K, Amstutz HC. Histological features of pseudotumor-like tissues from metal-on-metal hips. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2010;468(9):2321-7.
104. Bisschop R, Boomsma MF, Van Raay JJ, Tiebosch AT, Maas M, Gerritsma CL. High prevalence of pseudotumors in patients with a Birmingham Hip Resurfacing prosthesis: a prospective cohort study of one hundred and twenty-nine patients. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 2013;95(17):1554-60.
105. Bestic JM, Berquist TH. Current concepts in hip arthroplasty imaging: metal-on-metal prostheses, their complications, and imaging strategies. *Seminars in Roentgenology*. 2013;48(2):178-86.
106. Grammatopoulos G, Pandit H, Kamali A, Maggiani F, Glyn-Jones S, Gill HS, et al. The correlation of wear with histological features after failed hip resurfacing arthroplasty. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 2013;95(12):e81.
107. Baskey SJ, Lehoux EA, Catelas I. Effects of cobalt and chromium ions on lymphocyte migration. *Journal of Orthopaedic Research*. 2017;35(4):916-24.
108. Igual Munoz A, Schwiesau J, Jolles BM, Mischler S. In vivo electrochemical corrosion study of a CoCrMo biomedical alloy in human synovial fluids. *Acta Biomaterialia*. 2015;21(Supplement C):228-36.
109. Wang Y, Yan Y, Su Y, Qiao L. Release of metal ions from nano CoCrMo wear debris generated from tribo-corrosion processes in artificial hip implants. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2017;68(Supplement C):124-33.
110. Posada OM, Gilmour D, Tate RJ, Grant MH. CoCr wear particles generated from CoCr alloy metal-on-metal hip replacements, and cobalt ions stimulate apoptosis and expression of general toxicology-related genes in monocyte-like U937 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014;281(1):125-35.
111. Dobbs HS, Minski MJ. Metal ion release after total hip replacement. *Biomaterials*. 1980;1(4):193-8.
112. Merritt K, Brown SA. Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1996(329 Suppl):S233-43.
113. Oliveira H, Santos TM, Ramalho-Santos J, de Lourdes Pereira M. Histopathological Effects of Hexavalent Chromium in Mouse Kidney. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2006;76(6):977-83.
114. Kanaji A, Orhue V, Caicedo MS, Viridi AS, Sumner DR, Hallab NJ, et al. Cytotoxic effects of cobalt and nickel ions on osteocytes in vitro. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2014;9:91.

115. Catelas I, Petit A, Zukor DJ, Huk OL. Cytotoxic and apoptotic effects of cobalt and chromium ions on J774 macrophages - Implication of caspase-3 in the apoptotic pathway. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2001;12(10-12):949-53.
116. Huk OL, Catelas I, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Petit A. Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro. *Journal of Arthroplasty*. 2004;19(8 Suppl 3):84-7.
117. Matharu GS, Berryman F, Judge A, Reito A, McConnell J, Lainiala O, et al. Blood Metal Ion Thresholds to Identify Patients with Metal-on-Metal Hip Implants at Risk of Adverse Reactions to Metal Debris: An External Multicenter Validation Study of Birmingham Hip Resurfacing and Corail-Pinnacle Implants. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 2017;99(18):1532-9.
118. Mantymaki H, Junnila M, Lankinen P, Seppanen M, Vahlberg T, Makela KT. Systematic Screening of Adverse Reactions to Metal Debris after Recap-M2A-Magnum Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty. *Scandinavian Journal of Surgery*. 2017;0(0):1457496916683093.
119. Agency M-MHPR. Medical Device Alert: Metal-on-metal (MoM) hip replacements: Birmingham Hip™ Resurfacing (BHR) system (Smith & Nephew Orthopaedics). In: Health Do, editor. Medical Device Alert2015.
120. De Haan R, Pattyn C, Gill HS, Murray DW, Campbell PA, De Smet K. Correlation between inclination of the acetabular component and metal ion levels in metal-on-metal hip resurfacing replacement. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*. 2008;90(10):1291-7.
121. Garbuz DS, Tanzer M, Greidanus NV, Masri BA, Duncan CP. The John Charnley Award: Metal-on-metal hip resurfacing versus large-diameter head metal-on-metal total hip arthroplasty: a randomized clinical trial. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2010;468(2):318-25.
122. Langton DJ, Joyce TJ, Mangat N, Lord J, Van Orsouw M, De Smet K, et al. Reducing metal ion release following hip resurfacing arthroplasty. *Orthopedic Clinics of North America*. 2011;42(2):169-80, viii.
123. Campbell PA, Kung MS, Hsu AR, Jacobs JJ. Do retrieval analysis and blood metal measurements contribute to our understanding of adverse local tissue reactions? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2014;472(12):3718-27.
124. Xie XL, Tang CY, Chan KY, Wu XC, Tsui CP, Cheung CY. Wear performance of ultrahigh molecular weight polyethylene/quartz composites. *Biomaterials*. 2003;24(11):1889-96.
125. Premnath V, Harris WH, Jasty M, Merrill EW. Gamma sterilization of UHMWPE articular implants: an analysis of the oxidation problem. *Ultra High Molecular Weight Poly Ethylene. Biomaterials*. 1996;17(18):1741-53.
126. Eyerer P, Ke YC. Property changes of UHMW polyethylene hip cup endoprostheses during implantation. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1984;18(9):1137-51.
127. Eyerer P, Kurth M, McKellup HA, Mittlmeier T. Characterization of UHMWPE hip cups run on joint simulators. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1987;21(3):275-91.

128. Oral E, Neils AL, Doshi BN, Fu J, Muratoglu OK. Effects of simulated oxidation on the in vitro wear and mechanical properties of irradiated and melted highly crosslinked UHMWPE. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2016;104(2):316-22.
129. Reinitz SD, Currier BH, Levine RA, Collier JP, Van Citters DW. Oxidation and other property changes of a remelted highly crosslinked UHMWPE in retrieved tibial bearings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2017;105(1):39-45.
130. Harris WH. The problem is osteolysis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1995(311):46-53.
131. Sochart DH. Relationship of acetabular wear to osteolysis and loosening in total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1999(363):135-50.
132. Kadoya Y, Kobayashi A, Ohashi H. Wear and osteolysis in total joint replacements. *Acta Orthopaedica Scandinavica Suppl*. 1998;278:1-16.
133. Dumbleton JH, Manley MT, Edidin AA. A literature review of the association between wear rate and osteolysis in total hip arthroplasty. *Journal of Arthroplasty*. 2002;17(5):649-61.
134. Green TR, Fisher J, Matthews JB, Stone MH, Ingham E. Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;53(5):490-7.
135. Wang A. A unified theory of wear for ultra-high molecular weight polyethylene in multi-directional sliding. *Wear*. 2001;248(1):38-47.
136. Muratoglu OK, Bragdon CR, O'Connor DO, Jasty M, Harris WH, Gul R, et al. Unified wear model for highly crosslinked ultra-high molecular weight polyethylenes (UHMWPE). *Biomaterials*. 1999;20(16):1463-70.
137. Lewis G. Properties of crosslinked ultra-high-molecular-weight polyethylene. *Biomaterials*. 2001;22(4):371-401.
138. Digas G, Karrholm J, Thanner J, Malchau H, Herberts P. Highly cross-linked polyethylene in cemented THA: randomized study of 61 hips. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2003(417):126-38.
139. McKellop H, Shen FW, Lu B, Campbell P, Salovey R. Development of an extremely wear-resistant ultra high molecular weight polyethylene for total hip replacements. *Journal of Orthopaedic Research*. 1999;17(2):157-67.
140. Amstutz HC, Takamura KM, Ebramzadeh E, Le Duff MJ. Highly cross-linked polyethylene in hip resurfacing arthroplasty: long-term follow-up. *Hip International*. 2015;25(1):39-43.
141. Veihelmann A, Szczesny G, Nolte D, Krombach F, Refior HJ, Messmer K. A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Research in Experimental Medicine (Berl)*. 1998;198(1):43-54.

142. Zysk SP, Gebhard HH, Pellengahr C, Refior HJ, Plitz W, Messmer K, et al. Inflammatory responses to wear particles in vivo: a novel model in the murine knee joint. *Orthopade*. 2003;32(4):305-11.
143. Utzschneider S, Bader R, Kretzer JP. DFG-Antrag Biologische Aktivität metallischer Abriebpartikel und Metallionen in vitro und in vivo. Deutsche Forschungsgesellschaft; 2013.
144. Kretzer JP. Partikelanalyse Metall. bereitgestellte Analyseergebnisse.
145. Kretzer JP. Generierung von Metallionen - Zusammensetzung der Lösung. bereitgestellte Analyseergebnisse.
146. Niedzwiecki S, Klapperich C, Short J, Jani S, Ries M, Pruitt L. Comparison of three joint simulator wear debris isolation techniques: acid digestion, base digestion, and enzyme cleavage. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;56(2):245-9.
147. Paulus AC, Schröder C, Sievers B, Frenzel J, Jansson V, Utzschneider S. Evaluation of different methods to eliminate adherent endotoxin of polyethylene wear particles. *Wear - An International Journal on the Science and Technology of Friction, Lubrication and Wear*. 2012;294–295:319–25.
148. Davda K, Lali FV, Sampson B, Skinner JA, Hart AJ. An analysis of metal ion levels in the joint fluid of symptomatic patients with metal-on-metal hip replacements. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*. 2011;93(6):738-45.
149. Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K. An improved intravital microscopy system. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*. 1997;17(6):322-7.
150. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*. 1995;15(5):244-9.
151. GV-SOLAS AfTd. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren 2009 [Available from: http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publikation/Tierschutzbeauftragte/tie_blutentnahme_09.pdf].
152. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*: Churchill Livingstone; 2008.
153. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2008;2008:pdb.prot4986.
154. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis & Rheumatology*. 1977;20(3):841-50.
155. Topolovec M, Cör A, Milošev I. Metal-on-metal vs. metal-on-polyethylene total hip arthroplasty tribological evaluation of retrieved components and periprosthetic tissue. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2014;34(Supplement C):243-52.

156. Shimmin A, Beaulé PE, Campbell P. Metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 2008;90(3):637-54.
157. Espallargas N, Fischer A, Muñoz AI, Mischler S, Wimmer MA. In-situ Generated Tribomaterial in Metal/Metal Contacts: current understanding and future implications for implants. *Biotribology (Oxf)*. 2017;10:42-50.
158. Atrey A, Hart A, Hussain N, Waite J, Shepherd AJ, Young S. Metal-on-metal total hip replacements with 36 mm heads a 5 minimum year follow up: Levels of ARMD remain low despite a comprehensive screening program. *Journal of Orthopaedics*. 2017;14(1):108-14.
159. Zylka-Menhorn V. Metall-Hüftendoprothesen: Was Ärzte Patienten raten können. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2012;109(14):708-9.
160. Pearson MJ, Williams RL, Floyd H, Bodansky D, Grover LM, Davis ET, et al. The effects of cobalt-chromium-molybdenum wear debris in vitro on serum cytokine profiles and T cell repertoire. *Biomaterials*. 2015;67:232-9.
161. Agency M-MHPR. All metal-on-metal (MoM) hip replacements. In: Health Do, editor. *Medical Device Alert* 2010.
162. Doorn PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC. Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998;42(1):103-11.
163. Ingham E, Fisher J. Biological reactions to wear debris in total joint replacement. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*. 2000;214(1):21-37.
164. Hanawa T. Metal ion release from metal implants. *Materials Science and Engineering: C*. 2004;24(6-8):745-52.
165. Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schutze E, Refior HJ, Messmer K. In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation*. 1999;6(4):281-90.
166. Zysk SP, Gebhard H, Plitz W, Buchhorn GH, Sprecher CM, Jansson V, et al. Influence of orthopedic particulate biomaterials on inflammation and synovial microcirculation in the murine knee joint. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2004;71(1):108-15.
167. Utzschneider S, Becker F, Grupp TM, Sievers B, Paulus A, Gottschalk O, et al. Inflammatory response against different carbon fiber-reinforced PEEK wear particles compared with UHMWPE in vivo. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(11):4296-304.
168. Zysk SP, Gebhard HH, Kalteis T, Schmitt-Sody M, Jansson V, Messmer K, et al. Particles of all sizes provoke inflammatory responses in vivo. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2005(433):258-64.
169. Howie DW, Manthey B, Hay S, Vernon-Roberts B. The synovial response to intraarticular injection in rats of polyethylene wear particles. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1993(292):352-7.

170. Kraft CN, Burian B, Perlick L, Wimmer MA, Wallny T, Schmitt O, et al. Impact of a nickel-reduced stainless steel implant on striated muscle microcirculation: a comparative in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;57(3):404-12.
171. Gelb H, Schumacher HR, Cuckler J, Ducheyne P, Baker DG. In vivo inflammatory response to polymethylmethacrylate particulate debris: effect of size, morphology, and surface area. *Journal of Orthopaedic Research*. 1994;12(1):83-92.
172. Wooley PH, Morren R, Andary J, Sud S, Yang SY, Mayton L, et al. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. *Biomaterials*. 2002;23(2):517-26.
173. Geng D, Xu Y, Yang H, Wang J, Zhu X, Zhu G, et al. Protection against titanium particle induced osteolysis by cannabinoid receptor 2 selective antagonist. *Biomaterials*. 2010;31(8):1996-2000.
174. Dai M, Zhong Y, Zong L, Yang X, Cheng M, Yang K. Inhibitory effects of vascular endothelial growth factor antibody on wear particle-induced osteolysis. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2012;26(6):647-51.
175. Merkel KD, Gebhardt M, Springfield DS. Rotationplasty as a reconstructive operation after tumor resection. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1991(270):231-6.
176. Schwarz EM, Benz EB, Lu AP, Goater JJ, Mollano AV, Rosier RN, et al. Quantitative small-animal surrogate to evaluate drug efficacy in preventing wear debris-induced osteolysis. *Journal of Orthopaedic Research*. 2000;18(6):849-55.
177. Carmody EE, Schwarz EM, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Viral interleukin-10 gene inhibition of inflammation, osteoclastogenesis, and bone resorption in response to titanium particles. *Arthritis & Rheumatology*. 2002;46(5):1298-308.
178. Wedemeyer C, Neuerburg C, Pfeiffer A, Heckeley A, Bylski D, von Knoch F, et al. Polyethylene particle-induced bone resorption in alpha-calcitonin gene-related peptide-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007;22(7):1011-9.
179. Rao AJ, Zwingenberger S, Valladares R, Li C, Lane Smith R, Goodman SB, et al. Direct subcutaneous injection of polyethylene particles over the murine calvaria results in dramatic osteolysis. *International Orthopaedics*. 2013;37(7):1393-8.
180. Warne BA, Epstein NJ, Trindade MC, Miyanishi K, Ma T, Saket RR, et al. Proinflammatory mediator expression in a novel murine model of titanium-particle-induced intramedullary inflammation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2004;71(2):360-6.
181. Epstein NJ, Warne BA, Spanogle J, Ma T, Bragg B, Smith RL, et al. Interleukin-1 modulates periprosthetic tissue formation in an intramedullary model of particle-induced inflammation. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005;23(3):501-10.
182. Yang SY, Yu H, Gong W, Wu B, Mayton L, Costello R, et al. Murine model of prosthesis failure for the long-term study of aseptic loosening. *Journal of Orthopaedic Research*. 2007;25(5):603-11.

183. Ma T, Ortiz SG, Huang Z, Ren P, Smith RL, Goodman SB. In vivo murine model of continuous intramedullary infusion of particles--a preliminary study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2009;88(1):250-3.
184. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *The American Journal of Pathology*. 1993;143(4):1055-62.
185. Utzschneider S. Verwendung von crosslinked Polyethylenen in der Knieendoprothetik und deren biologische Aktivität in vivo. univ habil. 2010:105-11.
186. Utzschneider S, Lorber V, Dedic M, Paulus AC, Schroder C, Gottschalk O, et al. Biological activity and migration of wear particles in the knee joint: an in vivo comparison of six different polyethylene materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014;25(6):1599-612.
187. Lorber V, Paulus AC, Buschmann A, Schmitt B, Grupp TM, Jansson V, et al. Elevated cytokine expression of different PEEK wear particles compared to UHMWPE in vivo. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014;25(1):141-9.
188. Taki N, Tatro JM, Nalepka JL, Togawa D, Goldberg VM, Rimnac CM, et al. Polyethylene and titanium particles induce osteolysis by similar, lymphocyte-independent, mechanisms. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005;23(2):376-83.
189. Ren W, Yang SY, Fang HW, Hsu S, Wooley PH. Distinct gene expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB and rank ligand in the inflammatory response to variant morphologies of UHMWPE particles. *Biomaterials*. 2003;24(26):4819-26.
190. Zhang C, Tang T, Ren W, Zhang X, Dai K. Influence of mouse genetic background on wear particle-induced in vivo inflammatory osteolysis. *Inflammation Research*. 2008;57(5):211-5.
191. Illgen RL, 2nd, Bauer LM, Hotujec BT, Kolpin SE, Bakhtiar A, Forsythe TM. Highly crosslinked vs conventional polyethylene particles: relative in vivo inflammatory response. *Journal of Arthroplasty*. 2009;24(1):117-24.
192. Hao HN, Zheng B, Nasser S, Ren W, Latteier M, Wooley P, et al. The roles of monocytic heat shock protein 60 and Toll-like receptors in the regional inflammation response to wear debris particles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;92(4):1373-81.
193. Hamamura K, Nishimura A, Iino T, Takigawa S, Sudo A, Yokota H. Chondroprotective effects of Salubrinal in a mouse model of osteoarthritis. *Bone and Joint Research*. 2015;4(5):84-92.
194. Jonitz-Heincke A, Schröder M, Hansmann D, Utzschneider S, Kretzer JP, Bader R. The influence of metallic ions from CoCr28Mo6 on the osteogenic differentiation and cytokine release of human osteoblasts. *Current Directions in Biomedical Engineering* 2015. p. 498.
195. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT. Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994;28(1):81-90.

196. Catelas I, Huk OL, Petit A, Zukor DJ, Marchand R, Yahia L. Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effects of size, concentration, and composition. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998;41(4):600-7.
197. Green TR, Fisher J, Stone M, Wroblewski BM, Ingham E. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials*. 1998;19(24):2297-302.
198. Margevicius KJ, Bauer TW, McMahon JT, Brown SA, Merritt K. Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *Journal of Bone Joint Surgery, American Volume*. 1994;76(11):1664-75.
199. Bragdon CR, Barr C, Berry D, Della Valle CG, K., Johanson PE, Malchau H. Minimum 13 Year Multi-Center Study of THR With Highly Cross-Linked Polyethylene and Standard Diameter Femoral Heads. *ISTA's 29th Annual Congress Boston, USA2016*.
200. McKellop H, Shen FW, DiMaio W, Lancaster JG. Wear of gamma-crosslinked polyethylene acetabular cups against roughened femoral balls. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1999(369):73-82.
201. Sakoda H, Voice AM, McEwen HM, Isaac GH, Hardaker C, Wroblewski BM, et al. A comparison of the wear and physical properties of silane cross-linked polyethylene and ultra-high molecular weight polyethylene. *Journal of Arthroplasty*. 2001;16(8):1018-23.
202. Saikko V, Calonius O, Keranen J. Effect of counterface roughness on the wear of conventional and crosslinked ultrahigh molecular weight polyethylene studied with a multi-directional motion pin-on-disk device. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;57(4):506-12.
203. Utzschneider S, Paulus A, Datz JC, Schroeder C, Sievers B, Wegener B, et al. Influence of design and bearing material on polyethylene wear particle generation in total knee replacement. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(7):2495-502.
204. Sethi RK, Neavyn MJ, Rubash HE, Shanbhag AS. Macrophage response to cross-linked and conventional UHMWPE. *Biomaterials*. 2003;24(15):2561-73.
205. Ingram JH, Stone M, Fisher J, Ingham E. The influence of molecular weight, crosslinking and counterface roughness on TNF-alpha production by macrophages in response to ultra high molecular weight polyethylene particles. *Biomaterials*. 2004;25(17):3511-22.
206. Hanna SA, Somerville L, McCalden RW, Naudie DD, MacDonald SJ. Highly cross-linked polyethylene decreases the rate of revision of total hip arthroplasty compared with conventional polyethylene at 13 years' follow-up. *The Bone & Joint Journal*. 2016;98-B(1):28-32.
207. Tendeloo NP. *Allgemeine Pathologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
208. Bauer TW, Schils J. The pathology of total joint arthroplasty.II. Mechanisms of implant failure. *Skeletal Radiology*. 1999;28(9):483-97.
209. Park JS, Ryu KN, Hong HP, Park YK, Chun YS, Yoo MC. Focal osteolysis in total hip replacement: CT findings. *Skeletal Radiology*. 2004;33(11):632-40.

210. Jonitz-Heincke A, Tillmann J, Klinder A, Krueger S, Kretzer JP, Hol PJ, et al. The Impact of Metal Ion Exposure on the Cellular Behavior of Human Osteoblasts and PBMCs: In Vitro Analyses of Osteolytic Processes. *Materials*. 2017;10(7):734.
211. Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE. Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clinical Toxicology (Phila)*. 2014;52(8):837-47.
212. Leyssens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*. 2017;387(Supplement C):43-56.
213. Burian B, Wimmer MA, Kunze J, Sprecher CM, Pennekamp PH, von Engelhardt LV, et al. Systemic spread of wear debris - an in-vivo study. *Zeitschrift Fuer Orthopadie Und Ihre Grenzgebiete*. 2006;144(5):539-44.
214. Hjorth MH, Stilling M, Soballe K, Bolvig LH, Thyssen JP, Mechlenburg I, et al. No association between pseudotumors, high serum metal-ion levels and metal hypersensitivity in large-head metal-on-metal total hip arthroplasty at 5-7-year follow-up. *Skeletal Radiology*. 2016;45(1):115-25.
215. Back DL, Young DA, Shimmin AJ. How do serum cobalt and chromium levels change after metal-on-metal hip resurfacing? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2005;438:177-81.
216. Hallab NJ. Biologic Responses to Orthopedic Implants: Innate and Adaptive Immune Responses to Implant Debris. *Spine* 2016;41 Suppl 7:30-1.

Eidesstattliche Versicherung

Ebinger, Kathrin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Messung der inflammatorischen Aktivität von Metallionen und Metall-
Abriebpartikeln von Endoprothesen im Vergleich zu Ultra-High-
Molecular-Weight Polyethylenen (UHMWPE) am Tiermodell**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15.03.2019

K. Ebinger

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Danksagung

Mein besonderer Dank für die Betreuung meiner Promotion und für die langjährige Unterstützung gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Sandra Utzschneider und meinem Betreuer Dr. med. Alexander Paulus.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation der Ludwig-Maximilians-Universität danken.

Auch die erfolgreiche Zusammenarbeit mit den Partnern des DFG-Projektes „Biologische Aktivität metallischer Abriebpartikel und Metallionen *in vitro* und *in vivo*“ möchte ich hier hervorheben. Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit spreche ich meinen Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) aus.

Einen unbezahlbaren freundschaftlichen Dienst erwies mir Theresia Steinkellner, mit der graphischen Umsetzung der Hüftgelenkabbildungen.

Frau Sandra Haßelt gilt besonderer Dank für die Mithilfe bei der Vor- und Nachbereitung der Versuche und ihrer Unterstützung im Rahmen der histologischen Färbung.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich ein herzliches Dankeschön für das gute Arbeitsklima und die große gegenseitige Hilfsbereitschaft aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei Hr. Dr. med. Alexander Crispin für die statistische Beratung bedanken.